

Modulation der BMP-2 Wirkung in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Martina Lichtenberg**
geboren am 14. Juni 1978 in Heidelberg

29. Februar 2004

Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:
Dritter Gutachter:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

ActR	Activin-Rezeptor
ALK	Activin-like Kinase
AU	Arbitrary Unit
Bambi	BMP und Activin membran-gebundener Inhibitor
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
bp	Basenpaare, Einheit für DNA-Längenangaben
BRE	BMP-Response Element
cDNA	complementary DNA
CHX	Cycloheximid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiotreitol
eBMPR-IA	extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-I Rezeptors
ECL	Enhanced Chemiluminescence
FCS	fötales Kälberserum
HDHC	Histon-Deacetylasen
kd	Kilo-Dalton, Einheit für Proteingröße
MCF-7	Östrogenrezeptor positive Mammakarzinom-Zelllinie
MIS	Mullerian Inhibiting Substance
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat

SF	serumfreie Versuchsbedingungen
SH	serumhaltige Versuchsbedingungen
Smad	Homologes Gen zu Mad (<i>Drosophila</i>) und Sma (<i>Caenorhabditis elegans</i>) in Vertebraten
TAE	Trisbase-Eisessig-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	5
1. DAS MAMMAKARZINOM	7
1.1 Die Knochenmorphogenesefaktoren	8
1.1.1 Aufbau des BMP-2	9
1.1.2 Struktur des BMP-2	10
1.1.3 Die BMP-Rezeptoren	11
1.1.3.1 Modulation der Signalübertragung	14
1.1.4 Die Zielgene der BMPs	15
1.2 Vorhabensbeschreibung	
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MCF-7	18
2.1.1 Zellkultivierung	18
2.1.2 Zellaussaat	18
2.2 Inkubation der Zellen	19
2.2.1 Inkubation unter Serumhaltigen (SH) Bedingungen	19
2.2.2 Inkubation unter Serumfreien (SF) Bedingungen	19
2.2.3 Kinetik der BMP-2 Induktion von Zielgenen	20
2.2.3.1 Inkubation mit BMP-2 und verzögerte Zugabe von eBMPR-IA	20
2.2.3.2 Inkubation mit eBMPR-IA und verzögerte Zugabe von BMP-2	20
2.2.4 Inkubation mit Actinomycin D	20
2.2.5 Inkubation mit Cycloheximid	20
2.3 Isolierung von Gesamt-RNA	21
2.3.1 RNA-Isolierung	21
2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	22
2.4 cDNA-Synthese	22
2.5 PCR (Polymerasekettenreaktion)	23
2.5.1 Verdünnungsreihen	25
2.6 Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese	25
2.6.1 Herstellung der Agarose-Gels und Probenauftrag	26
2.6.2 Gellauf und Auswertung	26
2.6.3 Ausmessung der Banden mit LabImage	27
2.7. Western Blot	27
2.7.1 Proteinisolierung	27
2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.7.3 Auftrennung der Proteine	28
2.7.3.1 Gelelektrophorese	28
2.7.3.2 Das Blotten	29

2.7.4 Antikörperinkubation	29
2.7.5 Entwicklung des Bildes	30
2.8 Auswertung	30
2.8.1 Statistische Auswertung	31
3. ERGEBNISSE	32
3.1 Modulation der BMP-2 Wirkung durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA unter serumhaltigen Bedingungen	32
3.1.1 Inkubation mit einer Konzentration von 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA	32
3.1.2 Inkubation mit einer Konzentration von 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA und einer Konzentration von 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA	35
3.1.2.1 Untersuchung der Modulation der Wirkung auf die Rezeptortyrosinkinase Sky bei einer Inkubation von 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA	37
3.1.3 Inkubation mit 100ng/ml BMP-2 und 200ng/ml eBMPR-IA für 24h	38
3.1.4 Zusammenfassung der Inkubationsversuche unter serumhaltigen Bedingungen	39
3.1.5 Inkubation mit BMP-2 und eBMRR-IA bei Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten	41
3.1.5.1 Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und dann Zugabe von 200 ng/ml eBMPR-IA nach 5 min, 10 min und 30 min	42
3.1.5.2 Inkubation mit 200 ng/ml eBMPR-IA und dann Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 nach 5 min, 10 min und 30 min	44
3.2 Modulation der BMP-2 Wirkung durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA unter serumfreien Bedingungen	46
3.2.1 Modulation durch BMP-2 und eBMPR-IA in unterschiedlichen Konzentrationen unter serumfreien Bedingungen	46
3.2.1.1 Id1-mRNA-Gehalt	48
3.2.1.2 Id2-mRNA-Gehalt	48
3.2.1.3 Id3-mRNA-Gehalt	48
3.2.1.4 Überprüfung der Signifikanzen	49
3.2.2 Zusammenfassung der Inkubationsversuche unter serumfreien Bedingungen	49
3.2.4 Versuche unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen im Vergleich	51
3.2.5 Vergleich zwischen Id1, Id2 und Id3	53
3.3 Intrazelluläre unspezifische Modulation der BMP-2 Wirkung	53
3.3.1 Inkubation mit Actinomycin D	53
3.3.2 Inkubation mit Cycloheximid	56
3.4 Western Blot	59
3.4.1 Nachweis der Id-Proteine in MCF-Zellen nach Inkubation mit BMP-2	59
3.4.2 Inkubation mit eBMPR-IA auf Proteinebene	60
4. DISKUSSION	62
5. LITERATURVERZEICHNIS	77
ANHANG	85

Zusammenfassung

Knochenmorphogenesefaktoren (BMPs) werden als vielseitige Regulatoren von Zellteilung, Wachstum, Differenzierung und Adhäsion beschrieben. Sie werden zunehmend mit einer erhöhten Proliferationsbereitschaft und einem aggressiveren Verhalten von Tumoren in Verbindung gebracht. Untersuchungen mittels RT-PCR haben ergeben, dass BMP-2 sowohl in primärem Mammakarzinom-Gewebe als auch in Mammakarzinomzelllinien exprimiert wird. Dort vermittelt es seine Wirkung über membranständige Rezeptoren. Zu seinen Zielgenen gehören unter anderem die Helix-loop-Helix-Proteine Id1, Id2 und Id3 und die Rezeptortyrosinkinase Sky, die ihrerseits mit einer erhöhten Malignität von Tumoren assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit sollte an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die BMP-2 Wirkung auf die Expression der Zielgene moduliert werden, um ein umfassenderes Verständnis der Signaltransduktion zu gewinnen.

Die Untersuchungen der Genexpression mittels RT-PCR haben ergeben, dass eine Inkubation über 4 h mit BMP-2 zu einer deutlichen Induktion der mRNA von Id1, Id2, Id3 und Sky führte. Die Veränderungen der mRNA-Niveaus waren statistisch signifikant. Eine maximale Induktion konnte bei BMP-2 Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml erzielt werden.

Mit Hilfe einer rekombinant hergestellten löslichen Form der extrazellulären Domäne des BMP-Typ-IA-Rezeptors (eBMPR-IA) wurde versucht, die Id-Genexpression über einen extrazellulären Effektor zu inhibieren. Bei Zugabe von eBMPR-IA in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 zu BMP-2, wie sie für das BMP-2 Protein bei seiner Rezeptorinteraktion beschrieben wurde, konnte die BMP-2 bedingte Induktion von Id1, Id2, Id3 und Sky in mehreren Konzentrationsverhältnissen bei 4- und 24-stündiger Inkubation deutlich inhibiert werden. Auch diese Ergebnisse waren statistisch signifikant. Die alleinige Zugabe von eBMPR-IA führte ebenso zu einer Abnahme des Id-mRNA-Gehalts.

Es wird vermutet, dass es sich bei den Id-Proteinen um direkte Zielgene handelt. Deswegen wurde auch die Kinetik der BMP-2 Induktion untersucht. Wurde der Inhibitor eBMPR-IA 5 min, 10 min oder 30 min nach BMP-2 zugegeben, so war kein Hemmeffekt mehr zu beobachten. Andererseits zeigte sich bei Vorinkubation mit eBMPR-IA und zeitverzögerter Zugabe von BMP-2 kein weiterer BMP-2 Effekt.

Untersuchungen von MCF-7 Zellen nach 24-stündiger serumfreier Kultivierung und 4-stündiger Inkubation mit BMP-2 und eBMPR-IA ergaben eine deutliche Erhöhung der Genexpression von Id1, Id2 und Id3. Der unter serumhaltigen Bedingungen gesehene Hemmeffekt war nicht zu beobachten.

Durch den Einsatz von intrazellulären unspezifischen Inhibitoren wurde versucht, die Signalübertragung des BMP-2 weiter zu charakterisieren. Untersuchungen mit Actinomycin D (0,2 µg/ml), einem Hemmstoff der Transkription, haben ergeben, dass trotz Anwesenheit inhibitorischer Level von Actinomycin D die BMP-2 Wirkung klar zu erkennen war. Dieses deutete darauf hin, dass posttranskriptionelle Prozesse bei der Regulierung der Id-Genexpression durch BMP-2 eine wichtige Rolle spielen.

Nach Inkubationen mit Cycloheximid (2 µg/ml), einem Hemmstoff der Proteinneusynthese, konnte eine BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine nicht mehr nachgewiesen werden. Eine kontinuierliche de-novo-Proteinsynthese scheint für die BMP-2 Wirkung von großer Bedeutung zu sein. Dies spricht dafür, dass kurzlebige akzessorische Proteine bei der Transkription oder posttranskriptionell beteiligt sind. Die Vermutung liegt nahe, berücksichtigt man auch die Ergebnisse der Inkubationen mit Actinomycin D, dass es sich um Proteine handelt, die die Stabilität der mRNA erhöhen.

Im Einklang mit den Ergebnissen auf mRNA-Niveau konnte im Western Blot auf Proteinebene gezeigt werden, dass BMP-2 in einer Konzentration von 100 ng/ml den Id1-Proteingehalt nach 1-, 2-, 4-, und 24-stündiger Inkubation wesentlich erhöhte. Mit einer Zunahme des Id1-Proteins um das 6,5fache im Vergleich zur Kontrollkultur wurde ein maximaler Effekt nach 24-stündiger Inkubation erzielt. Ebenso eindrucksvoll nahm der Id-Proteingehalt durch Einsatz des Inhibitors eBMPR-IA auf unter 30 % ab.

Es ist gut vorstellbar, dass die erhöhte Aggressivität, die für BMPs in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben werden, zu einem Teil durch die Regulierung von den Helix-loop-Helix Proteinen Id1, Id2 und Id3 und der Rezeptortyrosinkinase Sky vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine mit Hilfe eines extrazellulären Inhibitors erfolgreich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene inhibiert wurde. Zusätzlich tragen die Untersuchungen entscheidend zum Verständnis der Signalübertragung des BMP-2 an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bei. Diese Erkenntnisse können in der Zukunft vielleicht dazu beisteuern, mit Hilfe von gezielten therapeutischen Handlungskonzepten die Therapie von Mammakarzinomen, oder anderen Tumorentitäten zu verbessern.

1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist bei Frauen in Europa und Nordeuropa eine sehr ernst zu nehmende Erkrankung. Mit 47 000 Neuerkrankungen pro Jahr und circa 19 000 tödlichen Krankheitsverläufen ist es die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen und in Europa und Nordamerika bei ihnen auch die häufigste Krebstodesursache (Albert et al., 2002). Eine von neun Frauen in Deutschland erkrankt in ihrem Leben an einem Mammakarzinom und die Rate der Neuerkrankungen nimmt weiter zu. Seine Inzidenz ist altersspezifisch und steigt mit zunehmendem Alter kontinuierlich an, aber auch immer mehr Frauen jüngeren Alters sind betroffen. In vielen epidemiologischen Studien sind Risikofaktoren beschrieben, die die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen. Dazu gehören unter anderem Angaben in der Anamnese wie das Alter bei der ersten Geburt über 27-30 Jahre beziehungsweise Nullipara, die Menopause, benigne Brusterkrankungen oder deutliches Übergewicht (Nayfield et al., 1991), aber auch Umwelteinflüsse und Stress werden diskutiert. Zusätzlich spielen genetische Faktoren in der Inzidenz des Mammakarzinoms eine große Rolle. Etwa 12 % aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom berichten über eine erstgradige Verwandte mit derselben Erkrankung und ein Prozent haben zwei oder mehr betroffene Familienmitglieder (Beral V, 2001). Des Weiteren wurden zwei Gene, BRCA1 und BRCA2, gefunden, die über einen autosomal-dominanten Erbgang auch in direktem Zusammenhang mit Mamma- und Ovarialkarzinomen stehen. Dennoch lassen sich weniger als 5 % aller Mammakarzinome ursächlich auf eine Genmutation eines der beiden Gene zurückführen (Anglian Breast Cancer Study Group, 2000). Auch Männer können an einem Mammakarzinom erkranken, aber diese Krebsfälle machen ungefähr nur 1 % der Gesamterkrankungen aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ihnen auch mit 68 Jahren höher als bei Frauen, bei denen das mittlere Erkrankungsalter bei 56 Jahren liegt und zwei Erkrankungsgipfel beschrieben werden: einer mit 43 Jahren und ein zweiter mit 59 Jahren.

Zur Therapie des Brustkrebses gibt es unterschiedliche prognostische und prädiktive Faktoren, die die individuelle Krankheitssituation möglichst genau widerspiegeln sollen und so die Möglichkeit bieten, ein Patienten-bezogenes Therapiekonzept zu erstellen. Zu den klinisch relevanten Prognosefaktoren, die deswegen bei jeder Patientin zum Zeitpunkt der Primärtherapie bestimmt werden sollten, gehören neben dem Alter der Nodalstatus, die Tumorgroße, der histologische Typ, das Grading und der Steroidhormonrezeptorstatus (Fitzgibbons et al., 2000). Des Weiteren werden neue tumorbiologische Prognosefaktoren gesucht, die helfen sollen, den Krankheitsverlauf noch genauer zu charakterisieren. Für den Plasminogenaktiva-

tor vom Urokinasetyp (uPA) und seinen Inhibitor PAI-1, die beide eine wichtige Rolle bei Invasion und Metastasierung spielen, ist die klinische Relevanz schon in Therapiestudien bewiesen (Jänicke et al., 2001). Im Bereich der Tumorzellproliferation werden zum Beispiel der Mitose-Index, die Ploidie oder Proliferationsfraktionen mit monoklonalen Antikörpern wie Ki67, MIB1 und PCNA untersucht oder in Bezug auf die Adhäsion E-Cadherin oder Integrine. Doch klinische Konsequenzen leiten sich aus den Ergebnissen momentan nicht ab (Harbeck et al., 2002). Für das Ansprechen auf eine Herceptin-Therapie ist zum Beispiel die Überexpression von HER2-Protein, die in 25% der Mammakarzinompatienten im Tumorgewebe zu finden ist, von großer Bedeutung (Revillon et al., 2001; Slamon et al., 2001). Durch die Erforschung tumorbiologischer Eigenschaften erhofft man sich ein besseres Verständnis der Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen und letztlich damit die Option auf eine gezielte therapeutische Behandlung des Mammakarzinoms (Harbeck et al., 2002).

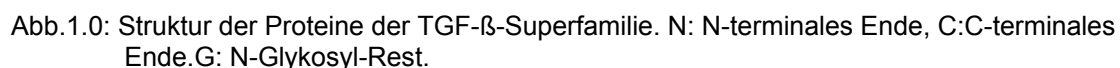
Phippard et al. haben 1996 das Vorkommen von BMPs (engl.: bone morphogenetic protein: Knochenmorphogeneseprotein) in Epithelzellen und in der fötalen und postnatalen Brustdrüse beschrieben. BMPs spielen in der Brust eine große Rolle in der Regulation der zyklischen Anpassung während Schwangerschaft, Stillzeit und Involution (Phippard et al., 1996). In der Annahme, dass Knochenmetastasen zu den häufigsten Metastasen beim Brustkrebs gehören, suchten Arnold et al. (1999) nach Proteinen, die in Mammakarzinomen exprimiert werden und die Metastasierung unterstützen könnten. Die Knochenmorphogenesefaktoren, die ursprünglich nur in Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel selbst gebracht wurden, woher sie auch ihren Namen tragen, wurden so nicht nur in der gesunden Brust, sondern auch in Brustkrebszelllinien gefunden (Arnold et al., 1999; Clement et al., 1999).

1.1 Die Knochenmorphogenesefaktoren

Die Knochenmorphogenesefaktoren sind Mitglieder der TGF- β (transforming growth factor)-Superfamilie. 1965 entdeckte Marshall Urist das osteoinduktive Potential von demineralisierter Knochenmatrix, führte diese auf bestimmte Moleküle zurück und gab ihnen den Namen bone morphogenetic proteins (Urist et al., 1965).

Im Anschluss an diese Entdeckung wurden die BMPs dann mit Hilfe immer besser werdender molekularbiologischer Methoden genauer charakterisiert und vielfach als potente Induktoren und wichtige Regulatoren des Knochenmetabolismus beschrieben (Wozney et al., 1988; Sampath et al., 1992; Vukicevic et al., 1989). Die TGF- β Superfamilie ist eine große Familie von Wachstumsfaktoren mit konservierter Polypeptidstruktur, die die Zellteilung, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und den Zelltod in praktisch allen metazoen Geweben regulieren können

Der Aufbau der Proteine der TGF- β -Superfamilie ist bei allen Mitgliedern sehr ähnlich. Sie werden als Präproproteine synthetisiert, die ungefähr drei Mal so lang sind wie die mature Domäne (Jones et al., 1994) (Abb.1.0). Jedes Protein besitzt eine N-terminale Signalsequenz, mit deren Hilfe es an die Zelloberfläche gelangt. Dort verbleibt es in der Extrazellulärmatrix. Des Weiteren besitzt es eine Prodomäne und eine mature Domäne am Carboxy-terminalen Ende. Solange die Prodomäne an das Protein gebunden ist, sind diese noch inaktiv. Erst durch die proteolytische Abspaltung der Prodomäne werden die Proteine aktiv (Hogan, 1996). Das Hauptstrukturmerkmal der TGF- β -Proteine ist ein hoch konserviertes Motiv aus 7 Cysteinen im reifen Protein.



9

1.1.2 Struktur des BMP-2

BMP-2 ist ein 32 kd großes homodimeres Protein. Es wird als ein 453 Aminosäuren langes Proprotein synthetisiert und nach Glykolisierung, proteolytischer Spaltung und Dimerisierung entsteht das reife Protein aus den 114 C-terminalen Proproteinresten (Lyons et al., 1991; Scheufler et al., 1999). Wie oben bereits erwähnt besitzt BMP-2 das für seine Superfamilie charakteristische Cysteinmotiv, wobei sechs Cysteinreste drei Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Ketten bilden während der siebte Cysteinrest eine Bindung zwischen den beiden Polypeptidketten des Dimers herstellt. Dieses Motiv wird Cysteiniknoten genannt und BMP-2 gewinnt dadurch deutlich an Stabilität (McDonald and Hendrickson, 1993; Murray-Rust et al., 1993) (Abb. 1.1). Die Sequenz am N-terminalen Ende, die dem ersten Cysteinrest vorangeht, besteht aus vielen positiv geladenen Aminosäuren und ist unter anderem für die Heparinbindung verantwortlich (Koenig et al., 1994; Ruppert et al., 1996).

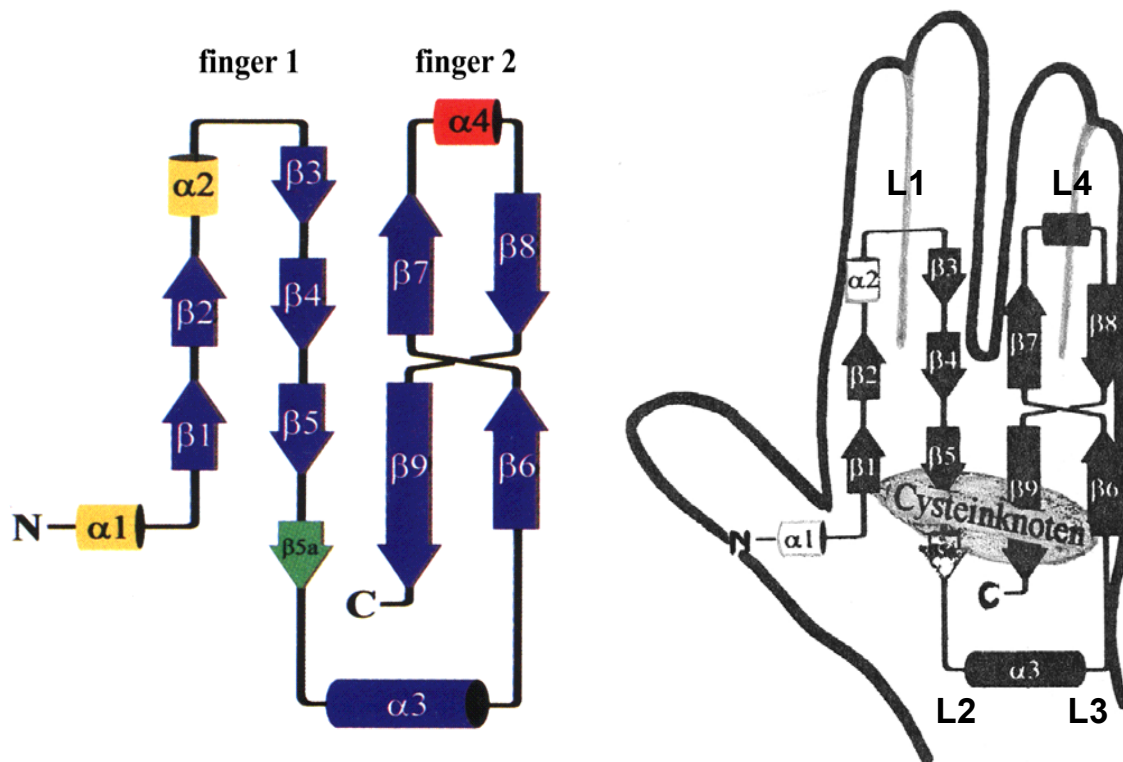


Abb. 1.1.: Die dreidimensionale Struktur von BMP-2 in Form einer Hand. α -Helices als Zylinder dargestellt, β -Faltblätter als Pfeile. N: N-terminales Ende. C: C-terminales Ende. Nach Scheufler et al. (1999).

Die dreidimensionale Struktur von BMP-2 wird mit einer linken Hand verglichen (Abb. 1.1.), wobei der Cystinknoten die Handfläche darstellt, die α -Helix den Handballen und zwei parallele β -Faltblattstrukturen zwei Finger (Daopin et al., 1992). Jeder der beiden Finger besteht aus zwei unterbrochenen β -Strängen, wobei sich in Höhe des zweiten Fingers die β -Stränge in der Mitte überschneiden. Die 4-fach gewundene α -Helix steht dabei fast in einem rechten

Winkel zu den beiden β -Faltblättern. Strukturelle Unterschiede zu anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie bestehen in den beiden Schleifen L1 und L4 an den Fingerspitzen, in der Orientierung der zentralen α -Helix und vor allem in der prähelikalen Schleife L2 und dem N-terminalen Segment. Während die zwei Schleifen L1 und L4 keine Rolle bei der Rezeptorbindung spielen, liegen die α -Helix und die Schleife L2 im Zentrum des Epitopes, welches eine wichtige Bedeutung für die Interaktion mit dem Typ-I-Rezeptor hat (Scheufler et al., 1999). Des Weiteren haben Fingerspitzen und α -Helix auch eine deutlich erhöhte Beweglichkeit, was eine Relevanz für die Rezeptorbindung zu haben scheint.

Das native BMP-2 ist ein Homodimer, wobei die beiden Untereinheiten in einem Winkel von 40° zueinander verschoben sind (Scheufler et al., 1999). Durch die Dimerisierung entsteht ein hydrophober Kern, der das Protein stabilisiert. Auch an der löslichen Oberfläche des BMP-2, besonders an beiden Seiten der Finger, gibt es große hydrophobe Bereiche. Dies scheint seine ungewöhnlich schlechte Löslichkeit zu erklären, denn BMP-2 neigt oft zur Aggregation (Ruppert et al., 1996).

Während BMP-2 in den meisten Fällen als Homodimer biologisch aktiv ist, werden zunehmend Heterodimere in der Literatur beschrieben, die funktionell den Homodimeren in ihrer biologischen Aktivität überlegen sein sollen (Hogan, 1996; Miyazono et al., 2001).

1.1.3 Die BMP-Rezeptoren

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und somit auch die Knochenmorphogenesefaktoren vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung über membranständige Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Komplexe aus zwei benachbarten Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Heldin et al., 1997; Massagué, 1998), wobei zwei verschiedene Typen unterschieden werden, der Typ-I-Rezeptor und der Typ-II-Rezeptor. Beide enthalten eine glykosylierte Cystein-reiche extrazelluläre Domäne, einen kurzen transmembranären Bereich und eine intrazelluläre Serin-/Threonin-Kinase-Domäne. Bisher wurden in Säugetieren fünf unterschiedliche Typ-II-Rezeptoren und sieben Typ-I-Rezeptoren beschrieben (Miyazono et al., 2000). Zu den Typ-II-Rezeptoren gehören der ActivinR Typ II und ActivinR Typ IIB (ActR-II und ActR-IIB), der TGF- β -Typ-II-Rezeptor (T β R-II), der MIS Typ II Rezeptor (MISR-II) und der BMP Typ II Rezeptor (BMPR-II). Die Typ-I-Rezeptoren werden als Activin receptor-like kinases (ALKs) bezeichnet. Unter den Typ-I-Rezeptoren ALK1 bis ALK7. wurden bisher drei Rezeptoren als BMP-bindend beschrieben, nämlich ALK-2, ALK-3 (auch BMPR-IA genannt) und ALK 6 (auch BMPR-IB) (Koenig et al., 1994; ten Dijke, 1994). Für die Signalübertragung sind beide

Rezeptorentypen von Bedeutung. Zwar können die BMPs, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern ihrer Superfamilie, an beide Rezeptoren auch alleine binden, eine hohe Affinität der Rezeptorinteraktion gibt es allerdings nur bei gleichzeitiger Bindung an beide Rezeptoren (ten Dijke et al., 1996). Zur Aktivierung binden die BMP-Homodimere parallel sowohl an den Typ-II- als auch an den Typ-I-Rezeptor. Dies stellt eine weitere Besonderheit der BMP-Signaltransduktion dar. Bei den TGF- β s zum Beispiel findet diese Bindung zeitversetzt statt (Liu et al., 1995). Nach der BMP-induzierten Bildung eines heteromeren Komplexes phosphoryliert die Rezeptorkinase des Typ-II-Rezeptors, der als konstitutiv aktiv postuliert wird, den Typ-I-Rezeptor in seiner GS-Domäne. Dabei handelt es sich um einen sehr Glycin- und Serin-reichen Bereich in der juxtamembranären Region, der für die Typ-I-Signalübertragung von großer Bedeutung ist (Wrana et al., 1994; ten Dijke et al., 1996). Der somit aktivierte Typ-I-Rezeptor initiiert nun die intrazelluläre Signalübertragung durch die Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle wie der Smads (Koenig et al., 1994). Diese Bezeichnung geht auf erste Beobachtungen zurück, die in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* gemacht wurden. Dort wurden Proteine wie Mother against DPP (MAD) und small body size (SMA) beschrieben, die eine wichtige Rolle in der BMP-Signalübertragung spielen. In Säugetieren wurden bis heute neun SMA/MAD-verwandte Proteine identifiziert, die deswegen auch den Namen Smad tragen (Heldin et al., 1997; Massagué, 1998). Anhand ihrer funktionellen Fähigkeiten werden drei unterschiedliche Gruppen von Smads unterschieden. Es gibt R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads), Co-Smads (common-mediator Smads) und I-Smads (inhibitorische Smads). Die R-Smads machen die Spezifität des intrazellulären Signals aus. Bei den Knochenmorphogenesefaktoren können Smad-1, Smad-5 und Smad-8 als R-Smads aktiviert werden. Die Spezifität in deren Bindung mit den Typ-I-Rezeptoren ALK-3 und ALK-6 liegt in der L45-Schleife auf Rezeptorseite und L3-Schleife bei den Smads begründet (Feng und Derynck, 1997; Chen et al., 1998). Die phosphorylierten R-Smads bilden daraufhin Komplexe mit den Co-Smads, welche für den Transport in den Zellkern verantwortlich sind. Diese Komplexe sind entweder Heterohexamere aus jeweils 3 Co-Smads und 3 R-Smads (Shi et al., 1997). Es werden aber auch trimere Smad-Komplexe eingegangen, das heißt es verbinden sich beispielsweise zwei Smad-1-Proteine mit einem Smad-4 (Kawabata et al., 1998). Im Zellkern erkennen R-Smads und Co-Smads spezifische Sequenzen in den Promotoren ihrer Zielgene über die MH1-Domäne, einen hoch konservierter Bereich aus ungefähr 130 Aminosäuren am N-terminalen Ende (Massagué, 1998). Auf diese Weise können sie die Transkription ihrer Zielgene regulieren. Die I-Smads, wie zum Beispiel Smad-6 und Smad-7, verhindern die Signaltransduktion. Einerseits konkurrieren sie mit den R-Smads um die Rezeptor-

bindung und verhindern so eine Phosphorylierung. Zusätzlich bildet Smad-6 auch Komplexe mit Smad-1 und beeinflusst so seine weitere Wirkung. Außerdem kann Smad-6 mit einem Homeobox-Protein, Hoxc8, im Zellkern interagieren und wirkt somit als transkriptioneller Repressor (Bai et al., 2000). Die Expression sowohl von Smad-6 als auch von Smad-7 erhöht sich in Abhängigkeit von BMP, Activin und TGF- β , was ein negatives Feedback dieser Signalübertragungswege vermuten lässt (Nakao et al., 1997; Ishisaki et al., 1998).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bei der BMP-Signaltransduktion ebenfalls Smad-unabhängige Signalwege eine wichtige Rolle spielen (Mulder, 2000). So existieren beispielsweise MAP Kinasen, wie ERK, JNK oder p38 MAP Kinase, die von BMPs aktiviert werden und Smad-unabhängig zu Veränderungen in der Transkription führen (Sano et al., 1999).

In der folgenden Arbeit wurde eine rekombinant hergestellte extrazelluläre Domäne des Typ-I-Rezeptors BMPR-IA (eBMPR-IA) verwendet. Deswegen wird auf seine Struktur an dieser Stelle noch einmal genauer eingegangen. Kirsch et al. (2000c) haben diesen sehr genau charakterisiert. Er besteht aus 5 β -Strängen und einer α -Helix und wird ebenfalls mit einer geöffneten linken Hand verglichen. Dabei symbolisiert die α -Helix den Daumen, die drei zentralen β -Stränge β_3 , β_4 und β_5 die Mittelfinger und das übrig bleibende Doppelfaltblatt aus β_1 und β_2 den kleinen Finger, der leicht in Richtung Handfläche zeigt (Kirsch et al., 2000c). Die Oberfläche des Rezeptorproteins ist relativ uneinheitlich. Im Allgemeinen ähnelt seine Faltung sehr der der Ektodomäne des Activin-Typ-II-Rezeptors ActRII sowie der diverser Neurotoxine aus Schlangengift. Deswegen wird sie auch als „three-finger-toxin-fold“ bezeichnet. Dennoch hat eBMPR-IA einige Strukturmerkmale, die sie von den genannten unterscheiden, vor allem in den Schleifen 1 und 3 und in der Nähe der α -Helix.

Die bindende Domäne von eBMPR-IA ist klein und besteht aus 89 Aminosäuren. Diese sind über ein kurzes, neun Aminosäure-langes Peptidsegment an den transmembranären Teil geknüpft. So liegt der bindende Teil des Rezeptors der Membran sehr nahe, was sich auf die Mobilität auswirkt. Das eigentliche Bindungssepitop besteht aus 24 Aminosäuren und liegt auf der konkaven Seite des Rezeptorproteins, beziehungsweise der Handfläche. Es trägt an der Oberfläche überwiegend unpolare Ladungen. Das BMP-2-Gegenstück hierzu wird aus beiden Monomeren gebildet, wobei sich BMP-2_A und BMP-2_B 16 beziehungsweise 8 Reste teilen. Diese bilden eine hydrophobe Tasche und nehmen dort den hydrophoben Rest Phe85 des Rezeptors auf. Wie oben bereits erwähnt, wird auch die Struktur der BMPs, als Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, mit einer Hand verglichen. Die Bindungsstelle des Rezeptors wird deswegen aufgrund ihrer außergewöhnlichen Lage in Bezug auf das BMP-Dimer auch „Handge-

lenks“(wrist)-Epitop genannt (Nickel et al., 2001). Ein weiteres Bindungsepitop wurde an den Außenflächen der Finger identifiziert und daraufhin als „Fingerknöchel“ (knuckle)- Epitop bezeichnet. Mutationen in einer der beiden Epitope führen zu einer veränderten biologischen Aktivität (Nickel et al., 2001)

1.1.3.1 Modulation der Signalübertragung

Die Signalwege der Knochenmorphogenesefaktoren können an unterschiedlichen Stellen beeinflusst werden. Als erster extrazellulärer Inhibitor der BMP-Wirkung wurde Noggin beschrieben. Dabei handelt es sich um ein 32 kd großes Glykoprotein, welches als Homodimer sezerniert wird und sich im Extrazellularraum befindet (Smith und Harland, 1992). Dort bildet es mit hoher Affinität Komplexe mit BMP und verhindert so die weitere Bindung von BMP an seinen membranständigen Rezeptor. Dies wurde zunächst für BMP-4 und später dann auch für BMP-2 gezeigt (Zimmermann et al., 1996; Massagué und Chen; 2000). Mit Chordin wurde ein weiterer direkter BMP-Antagonist gefunden. Seine inhibitorische Wirkung, beziehungsweise die seines Homologen SOG (short gastrulation) in der Fliege wird durch einen Co-Faktor, TSG (twisted gastrulation) sogar noch verstärkt (Ross et al., 2001; Scott et al., 2001; Chang et al., 2001). Erst kürzlich wurde eine neue Familie von Zytokinen beschrieben, die auch die Eigenschaft haben, die BMP-Wirkung zu antagonisieren. Die Dan-Familie umfasst beispielsweise Gremlin, Cerberus, Dan und PRDC. Hierbei handelt es sich ebenfalls um sekretorische Proteine, die jedoch in ihrer Sequenz keinerlei Ähnlichkeiten mit Noggin und Chordin haben (Hsu et al., 1998). Da sie die BMPs jedoch über den gleichen Mechanismus inhibieren, wird angenommen, dass Strukturähnlichkeiten bestehen und beispielsweise alle Antagonisten dieselbe Bindungsstelle für das zu bindende BMP besitzen (Hsu et al., 1998). Mitglieder der Dan-Familie wurden auch schon früher charakterisiert, nur damals war der Mechanismus, über den sie inhibieren, noch unklar. So wurde Cerberus als ein Kopfanlagefaktor gefunden, der vor allem im anterioren Endomesoderm des Gastrula Organizer zu finden ist (Bouwmeester et al., 1996) und für Dan wurden Tumor unterdrückende Fähigkeiten beschrieben (Ozaki und Sakiyama, 1993).

Ein weiterer extrazellulärer aber membrangebundener Inhibitor ist Bambi (BMP und Aktivin membran-gebundener Inhibitor). Bambi ähnelt sehr stark dem Typ-I-Rezeptor, jedoch besitzt er selbst keine Kinaseaktivität. So kommt es nach der Bindung von BMPs zu keiner intrazellulären Signaltransduktion (Tsang et al., 2000).

Die Inhibition des Signals im Zytoplasma geschieht über die inhibitorischen Smads, Smad-6 und Smad-7, auf die oben schon genauer eingegangen wurde. Auch im Zellkern selbst kann

die Signalübertragung gehemmt werden. Verschiedene transkriptionelle Co-Repressoren werden in der Literatur beschrieben (Massagué und Chen, 2000; Miyazono, 2000). Dazu gehören beispielsweise TGIF, c-Ski und SnoN. Alle drei interagieren mit der MH-2-Domäne von Smad-2 und Smad-3 und rekrutieren auf diesem Weg Histon-Deacetylasen (HDACs) (Massagué und Chen, 2000).

Der Übertragungsweg der Mitglieder der TGF- β -Familie wird aber nicht nur negativ reguliert, sondern es gibt auch unterschiedliche akzessorische Faktoren. Für TGF- β werden beispielsweise Betaglycan und Endoglin als Akzessoren beschrieben, die die Bindung an den TGF- β -Rezeptor verstärken (Massagué, 1998). Des Weiteren existieren mehrere Cofaktoren, die die Bindung der Smads an die DNA verstärken, wie zum Beispiel FAST (Chen et al., 1997), OAZ (Hata et al., 2000) und Mixer und Milch (Germain et al., 2000). Sie selbst haben alle keine eigene intrinsische Aktivität und können so ihre Wirkung nur in Zusammenarbeit mit den Smads entfalten. Die kürzlich beschriebenen Transkriptionsfaktoren AP-1 (Jun-Fos) (Zhang et al., 1998), TFE3 (Hua et al., 1999) und AML Proteine (Hanai et al., 1999) unterstützen ebenfalls das Smad-Signal, können aber auch unabhängig von Smads in anderen Zusammenhängen regulatorisch in die Transkription von Zielgenen eingreifen.

1.1.4 Die Zielgene der BMPs

Unter den Zielgenen der BMPs finden sich eine Reihe von extrazellulären Matrixproteinen, wie zum Beispiel Osteocalcin, Kollagen Typ α , Bone Sialo Protein und Dekorin, oder Enzyme, wie die Alkalische Phosphatase. Aber auch die Expression von Inhibitoren der BMP-Wirkung, Smad 6 und Smad 7, und Regulatoren der Transkription wird durch BMPs verändert. Einige Gene hiervon sind direkte Zielgene und werden unmittelbar durch BMPs beeinflusst, während andere indirekt erst nach längerem Einwirken von BMPs induziert werden, so zum Beispiel Osteocalcin (Katagiri et al., 1994). Auch die Alkalische Phosphatase ist ein typisches Beispiel für ein spätes Zielgen. Ihre Aktivitätserhöhung, die sehr schön über die Luciferase-Lichtreaktion sichtbar gemacht werden kann, gehört zu den Standardnachweismethoden der BMP-induzierten Osteoblastendifferenzierung. Die Homeobox Gene Msx-1 und Msx-2 werden auch direkt durch BMP reguliert (Graham et al., 1994). Und für diese beiden, ebenso wie für BMP-2 und BMP-4 wurde gezeigt, dass sie in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium in der fötalen und postnatalen Brustdrüse exprimiert werden (Phippard et al., 1996).

Als ein weiteres Zielgen der BMPs wurde das kodierende Gen für Id-1 (Inhibitor of differentiation) gefunden (Ogata et al., 1993; Katagiri et al., 1994). Die Id-Proteine gehören zu den

Helix-loop-Helix-Proteinen (HLH). Ihnen fehlt allerdings die basische DNA-bindende Domäne. Wenn sie mit anderen bHLH-Proteinen Heterodimere bilden, sind diese also nicht funktionstüchtig. Deswegen gelten die Id-Proteine als dominant negative Regulatoren der bHLH und als potente Inhibitoren der Differenzierung (Benezra et al., 1990). Von Hollnagel et al. wurden auch die Gene der beiden Id-1 verwandten Proteine Id-2 und Id-3 in embryonalen Stammzellen als direkte BMP-Zielgene charakterisiert (Hollnagel et al., 1999) und Clement et al. zeigten, dass in der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Id-1, Id-2 und Id-3-Expression BMP-2 abhängig stark ansteigt (Clement et al., 2000). Erst kürzlich wurde von zwei Arbeitsgruppen ein BMP-responsives Element auf dem Id-1 Promoter beschrieben, das aus einer GC-reichen Region zwischen –985 bp und –957 bp liegt und für die Smad-1/-4 vermittelte Transkription der Id-Proteine verantwortlich zu sein scheint (Katagiri et al., 2002; Korchynskyi und ten Dijke, 2002). Dies kann auch für die Entstehung von Tumoren von entscheidender Bedeutung sein, da in der Tumorigenese ebenfalls Differenzierungsstörungen als mögliche Ursache gelten.

1.2 Vorhabensbeschreibung

Die Knochenmorphogenesefaktoren wurden in letzter Zeit zunehmend mit einer größeren Proliferationsbereitschaft und einem aggressiveren Potential von Tumoren in Verbindung gebracht (Ghosh-Choudhury et al., 2000; Pouliot et al., 2003). Auch in mehreren Mammakarzinomen konnten die BMPs schon nachgewiesen werden (Arnold et al., 1999; Clement et al., 2000). Deswegen scheint es von großer Bedeutung, die Wirkungsweise der BMPs weiter zu untersuchen und auch die Signalübertragung der BMPs auf Ihre Zielgene weitergehend zu erforschen. Die Id-Proteine sind in diesem Zusammenhang sehr interessant, da sie Ihrerseits auch immer mehr mit einem erhöhten malignen Potential und einem schlechteren klinischen Outcome in Karzinomen beschrieben werden (Schindl et al., 2003; Schoppmann et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die von rekombinantem BMP-2 abhängige Expression von Id1, Id2, Id3 und Sky in der hormonabhängigen Östrogen-Rezeptor positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Die BMP-2 Wirkung wurde dabei durch unterschiedliche Einflüsse moduliert mit dem Ziel, ein umfassenderes Verständnis der BMP-2 Signaltransduktion zu erwerben.

Durch den Einsatz von dem extrazellulären spezifischen Inhibitor eBMPRI-A, einer rekombinant hergestellten Form der extrazellulären Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors A, wurde versucht, die BMP-2 Wirkung zu inhibieren und bei zeitlich verzögerten Zugabe Erkenntnisse über die Kinetik der BMP-2/Rezeptor-Interaktion zu gewinnen. Auf intrazellulärem Niveau

wurde mit Hilfe von unspezifischen Inhibitoren der Transkription und Translation die weitere Signaltransduktion des BMP-2 charakterisiert. Die veränderten Genexpressionen der Zielgene wurden mittels RT-PCR bestimmt. Außerdem wurde die BMP-2 Wirkung im Western Blot auch auf Proteinebene untersucht.

Ziel der Versuche war es, die Signaltransduktion des BMP-2s in der Mammakarzinomzelllinie weit reichender zu verstehen. Aus den hier gewonnenen Erkenntnissen könnten Ansatzpunkte für mögliche spätere Therapiekonzepte gefunden werden.

2. Material und Methoden

2.1 MCF-7

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville) bezogen. Sie wurde mit Dulbecco's Modifiziertem Eagles Medium (DMEM)-High Glucose plus 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Sowohl Zellkulturmedium als auch Kälberserum wurden von Invitrogen (Eggenstein) bezogen.

2.1.1 Zellkultivierung

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank (Heraeus) durchgeführt.

Die Zellen wurden rasch aufgetaut, mit 1 ml DMEM plus 10 %FCS versetzt, in ein 15 ml-Gefäß (Falcon) gegeben und minütlich wurde 1ml Medium zugegeben bis ein Volumen von 10 ml erreicht war. Das Gemisch wurde zentrifugiert (24°C, 5 min., 1000 U/min, Hettich Universal 30 RF), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 7 ml Kulturmedium aufgelöst und über Nacht in einer 25 cm²-Gewebekulturflasche (Cellstar®, Greiner bio-one, Frickenhausen) im Brutschrank (5 % CO₂, 37°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter einem Mikroskop (Zeiss, Jena) beurteilt. War der Zellrasen noch nicht zu 2/3 dicht, wurde nur das Medium gewechselt und die Zellen nach zwei Tagen neu beurteilt. Bei einem nahezu geschlossenen Zellrasen wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin EDTA (Invitrogen, Eggenstein) abgelöst, mit 19 ml Medium versetzt und in 75 cm²-Gewebekulturflaschen (große Zellkulturflaschen) gegeben. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt bei 90 % dichtem „Zellrasen“ wurden die Zellen auf zwei oder drei neue Flaschen gesplittet. Das heißt die Zellen wurden abtrypsiniert und nach Zentrifugation auf die Flaschen verteilt.

2.1.2 Zellaussaat

Um die Inkubationsversuche durchzuführen, mussten die Zellen in definierten Mengen ausgesät werden, um einen definierten Anfangszustand zu haben. Für alle Versuche wurden jeweils 1×10⁶ Zellen MCF-7 verwendet. Hierzu wurde aus den großen Zellkulturflaschen das Nährmedium entfernt und sie wurden zweimal gründlich mit PBS (Invitrogen) gespült. Danach wurden 2 ml Trypsin EDTA auf den Boden der Flasche gegeben, und man ließ es max. 5 min einwirken, damit sich die Zellen von der Plastikoberfläche lösten. In 6-9 ml Medium wurden die abtrypsinierten Zellen aufgenommen, das Gemisch wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun erneut in 4-5 ml DMEM plus 10 % FCS aufge-

nommen und die Zellzahl wurde mit einem Zellzählgerät (Beckman Coulter, Krefeld) bestimmt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden mit einer Pipette (Eppendorf) in 3 ml Kulturmedium in eine 25 cm²-Gewegekulturflasche gegeben. Die Zellen blieben über Nacht im Brutschrank.

2.2 Inkubation der Zellen

2.2.1 Inkubation unter Serumhaltigen (SH) Bedingungen

Alle Inkubationen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Versuche zu jeder Inkubationsdauer, Konzentration oder bei Zugabe eines anderen Reagenz zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dreifach wiederholt.

Inkubiert wurde für 4 h und 24 h unter serumhaltigen Bedingungen mit 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml BMP-2 und mit jeweils der doppelten Menge eBMPR-IA, das heißt 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml. Beide Proteine wurde uns in rekombinanter Form von Dr. Peter Hortschansky (HKI, Jena) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Inkubation wurde zuerst das alte Nährmedium bei allen Flaschen abgekippt, und sie wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurde zum Zeitpunkt null auf zwei Flaschen, als Kontrolle, nur 2 ml DMEM plus 10 % FCS gegeben wurden. Zwei weitere wurden zusätzlich zum Medium (jeweils 2 ml DMEM mit 10 % FCS) mit BMP-2 inkubiert, die weiteren zwei Flaschen mit eBMPR-IA, wobei die 1:2 (BMP-2 / eBMPR-IA) Stöchiometrie streng eingehalten wurde. Schließlich wurde sowohl BMP-2 als auch eBMPR-IA zugegeben. Je nach Versuchsdurchführung variierte die Inkubationszeit (4 h oder 24 h).

2.2.2 Inkubation unter Serumfreien (SF) Bedingungen

Für die Versuchsdurchführung unter serumfreien Bedingungen wurde den am Vortag ausgesäten Zellen (siehe 2.1.2) am nächsten Tag zunächst das Nährmedium entzogen. Danach wurden sie gründlich 2-3-mal mit PBS gespült. Nach Zugabe von 3 ml DMEM ohne FCS auf jede einzelne Flasche kamen sie für eine weitere Nacht in den Brutschrank. Durch den Entzug des Nährmediums über 24 h wurden die Zellen künstlich in eine Art Hungerzustand versetzt. Inkubiert wurde genau wie unter serumhaltigen Bedingungen mit 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml BMP-2, mit 50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml eBMPR-IA und mit BMP-2 und eBMPR-IA bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen. Auch hier variierte die Inkubationszeit von (4 h oder 24 h).

2.2.3 Kinetik der BMP-2 Induktion von Zielgenen

Zur Verfügung standen bei dieser Versuchsdurchführung jeweils 12 Flaschen mit 1×10^6 Zellen MCF-7. Der Versuch wurde unter serumhaltigen Bedingungen durchgeführt. Auf alle Flaschen wurden 2 ml DMEM plus 10 % FCS gegeben.

2.2.3.1 Inkubation mit BMP-2 und verzögerte Zugabe von eBMPR-IA

Während in den ersten beiden Flaschen nur das Medium gewechselt wurde, wurde in die nächsten beiden Flaschen 100 ng/ml BMP-2 und in zwei weitere 200 ng/ml eBMPR-IA gegeben. Die 6 übrigen Flaschen wurden alle mit 100 ng/ml BMP-2 inkubiert. Zu jeweils zwei wurde nach 5 Minuten, nach 10 Minuten und nach 30 Minuten 200 ng/ml eBMPR-IA gegeben.

Von dem Zeitpunkt ab, zu dem die ersten Flaschen mit BMP-2 inkubiert wurden, betrug die Inkubationszeit 24 Stunden.

2.2.3.2 Inkubation mit eBMPR-IA und verzögerte Zugabe von BMP-2

Die Versuchsdurchführung war genau wie bei 2.2.5.1, nur dass die letzten 6 Flaschen hier zuerst mit 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert wurden und nach 5 Minuten, 10 Minuten und 30 Minuten 100 ng/ml BMP-2 dazugegeben wurde. Inkubiert wurde für insgesamt 24 Stunden.

2.2.4 Inkubation mit Actinomycin D

In niedrigen Konzentrationen hemmt Actinomycin D die DNA-abhängige RNA-Biosynthese. Es wurde verwendet, um zu klären, ob der beobachtete Effekt von eBMPR-IA auf die Neubildung von RNA zurückzuführen war. Die Inkubationsversuche mit Actinomycin D wurden alle unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden die 25 cm²-Zellkulturflaschen wie oben beschrieben serumfrei gemacht.

Bei der Versuchsdurchführung wurden 8 Flaschen für 15 min mit Actinomycin D in einer Konzentration von 0,2 µg/ml vorinkubiert. Danach wurde zügig zu zwei Flaschen 100 ng/ml BMP-2, zu zwei anderen 200 ng/ml eBMPR-IA gegeben, zwei weitere wurden sowohl mit BMP-2 als auch eBMPR-IA mit obigen Konzentrationen inkubiert. Zwei Flaschen wurden ohne weitere Zugabe als Kontrolle mitgeführt. Die Inkubationszeit betrug 6 h.

2.2.5 Inkubation mit Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Proteinsynthesehemmer eukaryoter Zellen. Auch die Inkubationsversuche mit Cycloheximid verliefen unter serumfreien Bedingungen. Die Zugabe von Cycloheximid in

einer Konzentration von 2 µg/ml erfolgte hier gleichzeitig mit der Zugabe der weiteren Inkubationssubstanzen. Inkubiert wurden die 8 Flaschen ansonsten wie in 2.2.3.

2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Aus den inkubierten MCF-7-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Das heißt nach Lyse der Zellen, Inaktivierung der RNasen und Isolierung der RNA erhielt man ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und der für uns wichtigen messenger RNA (mRNA). Diese machte zwar nur einen Anteil von ungefähr 2 % aus, für die folgenden Anwendungen, wie die RT-PCR, war die isolierte Menge aber ausreichend. Die RNA-Isolierung und die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Zellkulturen wurde mit Hilfe des RNeasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte Gesamt-RNA größer als 200 bp gewonnen werden. Zur Lyse der Zellen wurden zu jeder Gewebekulturflasche 500 µl RLT-Puffer und 5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) gegeben. Der Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, eine stark denaturierende Verbindung, um RNasen zu inaktivieren. So wurde die RNA vor Abbau geschützt.

Das Zelllysat wurde dann mit Zellschabern (Nunc) gewonnen und mit Pipetten auf eine feine Membran (Qias shredder Spin Column) gegeben und zentrifugiert (24°C, 2 min., 14000U/min., Eppendorf Centrifuge 5415 C). Noch enthielt das visköse Gemisch große Mengen an hochmolekularer genomischer DNA, die zum Teil im Filter hängen blieb. Zum Filtrat wurden 500 µl 70 %iges Ethanol hinzugefügt und das Gemisch dann auf eine spezielle RNA-bindende Silica-Gel-Membran (RNeasy Spin Column) gegeben. Erneut wurde zentrifugiert (24°C, 10 sec., 10000U/min.).

Nun folgten einige Arbeitsschritte, um die Membran von störenden restlichen Kontaminationen zu säubern. Zunächst wurden 500 µl RW1-Waschpuffer, eine in pH-Wert und Salzgehalt exakt eingestellte Lösung, auf die Membran gegeben und 5 Minuten einwirken gelassen. Danach wurde zentrifugiert (24°C, 10 sec., 10000U/min) und zweimal mit 300 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach jeder Waschung wurde zentrifugiert, das erste Mal 15 sec., das zweite Mal 2 Minuten, jeweils bei Raumtemperatur und 10000U/min.

Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl Rnase-freiem Wasser in zwei Arbeitsschritten (30µl und 20µl), wobei nach Zugabe jeweils für eine Minute mit 10000U/min. zentrifugiert wurde.

Die RNA wurde dann in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei –80°C gelagert oder gleich zur Synthese der cDNA verwendet.

2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration war von großer Bedeutung, um später gewährleisten zu können, dass jeweils die gleiche Menge an RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Gemessen wurde mit einem UV-Spektro-Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec III). Dieses wurde zunächst mit destilliertem Wasser geeicht. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten (HELLMA), da diese UV-Licht nicht absorbieren. Die RNA wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt (3 µl RNA auf 297 µl destilliertem Wasser) und ihre Absorption bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm ermittelt. RNA hatte ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, während bei 280 nm Proteine und bei 320 nm andere Verunreinigungen erfasst werden konnten. Das Photometer konnte so die Reinheit des Eluates berechnen und aus dem Absorptionswert bei 260 nm die RNA-Konzentration bestimmen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Gesamt-RNA-Konzentration errechnet.

2.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde pro Ansatz 1 µg Gesamt-RNA benötigt. Grundlage der Reversen Transkription war die Funktion des Enzyms „Reverse Transkriptase“, das zu einer RNA-Matrize, ausgehend von einem Primer, nach dem Prinzip der Basenpaarung einen komplementären DNA–Strang synthetisiert. Es wurde ein Oligo(dT)-Primer aus 16-20 Thyminresten verwendet, der an die Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende eukaryotischer mRNA-Moleküle band. Die mRNA kann aber bis zu 10 kb lang sein und die Protein-kodierende Sequenz liegt nicht immer in der Nähe des 3'-Endes. Da die Reversen Transkriptasen aber durchschnittlich nur cDNAs von 1-2 kb Länge synthetisieren, wurden zusätzlich Random-Primer benutzt. Sie waren ein Gemisch aus unterschiedlichen Hexanukleotiden und banden damit an beliebiger Stelle der RNA-Sequenz dort, wo eben die komplementären Sequenzen angetroffen wurden. So waren nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit alle mRNA-Bereiche in dem cDNA-Gemisch vertreten.

Zur Synthese lagerten sich an das freie 3'-OH-Ende des Primers gemäß der Basenpaarung des komplementären Stranges das jeweilige Desoxyribonukleosidtriphosphat.

Zur Hemmung der RNasen wurde zusätzlich RNasin in das Reaktionsgemisch gegeben. Dieses Enzym bildete nichtkovalente Komplexe mit RNasen und inhibierte somit ihre Wirkung.

Zur Durchführung der cDNA-Synthese wurde die Gesamt-RNA (1 µg RNA auf 8,5 µl Wasser) für 5 min im Wasserbad bei 65°C erhitzt. Währenddessen wurde das Reaktionsgemisch auf Eis vorbereitet. Es enthielt pro Ansatz RNA:

4 µl	5x Reaktionspuffer (250 mMol Tris-HCl; pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	Oligo-dT-Primer (0,2 mg/ml)
1 µl	Random-Primer (0,2 mg/ml)
2 µl	dNTP-Mix (2,5mM)
0,5 µl	RNasin (20 U)
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen).

Die 11,5 µl des Reaktionsgemisches wurden nun zur RNA gegeben und zunächst bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, um den Primern die Zeit zu geben, sich an die RNA-Stränge anzulagern. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dabei kam es zur eigentlichen reversen Transkription. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Ansätze für 5 min bei 95°C ins Wasserbad gegeben, wobei das Enzym denaturierte. Die gewonnene cDNA konnte nun zur Polymerasekettenreaktion verwendet oder zunächst bei –20 Grad gelagert werden.

2.5 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR= polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleotidsequenzen. Die PCR erlaubt semiquantitativ Rückschlüsse auf die Menge der zur cDNA korrelierenden mRNA eines bestimmten Proteins. Bei der Methode dient der zuvor aus der Reversen-Transkriptase-Reaktion gewonnene Strang (RT= Reverse Transkription) cDNA als Matrize (template), entlang der nun mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase die DNA vervielfacht wird. cDNA-Synthese und nachfolgende PCR werden auch als RT-PCR bezeichnet. Der Ansatz für eine Probe cDNA enthält:

18,3 µl	Aqua dest
2,5 µl	10x PCR-Puffer (Qiagen)
1,0 µl	Primer-Gemisch (jeweils 10 µM sense- und antisense-Primer)
2,0 µl	dNTP-Gemisch (jeweils 10µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase (entspricht 1U; Qiagen)

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, wobei stets darauf geachtet wurde, dass die Taq-Polymerase als letztes zu dem Gemisch gegeben wurde. 1 µl der cDNA wurde jeweils in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) vorgelegt, 24 µl von dem Mix dazugegeben, das Ganze wurde kurz gemischt, abzentrifugiert und danach mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Öl war von großer Bedeutung um die Verdunstung bei den später zu erreichenden hohen Temperaturen zu vermeiden. Parallel zu den Proben mit jeweils dem gleichen Primer wurde stets eine Kontrolle geführt, in die statt der cDNA 1µl Aqua dest gegeben wurde, um so Reaktionen anders als mit der cDNA zu entdecken. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden nun zur eigentlichen Polymerasekettenreaktion in den TRIO-Thermozykler (Biometra, Göttingen) gestellt. Dieser enthielt Thermoblöcke, die zyklisch erhitzt und abgekühlt werden können und so die notwendigen Bedingung für eine PCR ermöglichen. Initial wurden alle Proben für 3 min auf 95°C erhitzt, um den DNA-Doppelstrang zu denaturieren. Dieser lange Denaturierungsvorgang war notwendig, um die sehr komplexen DNA-Strukturen aufzulösen. Anschließend folgte ein Zyklus aus 3 Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation, der je nach eingesetztem Primer 25-35mal durchlaufen wurde. Zur Denaturierung wurden die Proben für jeweils 30 sec auf 95°C erhitzt. Das folgende Annealing diente der Anlagerung der Primer an die DNA-Sequenz. Die Bedingungen hierfür hingen sehr stark von den jeweiligen Primern ab. So wurde je nach Primer der Ansatz für eine bestimmte Zeit auf eine bestimmte Temperatur abgekühlt, um die besten Bedingungen für die Bindung an die DNA zu gewährleisten. Daran schloss sich jeweils für 30 sec die Phase der Elongation an. Dies geschah bei einer Temperatur von 74°C, in der das Aktivitätsoptimum der verwendeten Taq-Polymerase lag. Nach dem letzten Zyklus war eine Phase der terminalen Elongation eingebaut, das heißt 5 weitere Minuten bei 74°C. In dieser abschließenden Phase konnten alle bereits ansynthetisierten Stränge die vollständige Länge erreichen.

Die einzelnen Id-Gene und β -Aktin hatten, wie oben bereits erwähnt, spezifische Zeiten und Temperaturen für das Annealing und unterschiedliche Zyklenzahlen. Die Programme der Id-Gene, Sky und β -Aktin und die spezifischen Primersequenzen waren wie folgt:

	SENSE	ANTISENSE
β -Aktin	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-GAACTTTGGGGGATGCTGC-3'
Id1	5'-AACCGCAAGGTGAGCAAGGTGG-3'	5'-ACGCATGCCGCTCGGC-3'
Id2	5'-GAAAGCCTTCAGTCCCGTG-3'	5'-TCATGAACAGTCCCGTG-3'
Id3	5'-TTCTTTCTCTTTGGGGCACC-3'	5'-CGCCTTGGCATAGTTTGGAG-3'
Sky	5'-GGTGGACATTGCCTGCCTGCGGCATGGA-3'	5'-CCCAAGATGTTCTCCAGTTCCATTTCGCA-3'

Abb.2.0: Spezifische Primersequenzen von Id1, Id2, Id3 und Sky

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zahl der Zyklen
β -Aktin	30sec/ 95°C	30sec/ 60,5°C	20sec/ 72°C	28
ID-1	30sec/ 95°C	20sec/ 66°C	25sec/ 72°C	34
ID-2	30sec/ 95°C	30sec/ 72°C	30sec/ 74°C	30
ID-3	30sec/ 95°C	30sec/ 72°C	30sec/ 74°C	30
Sky	60sec/ 95°C	60sec/ 58°C	30sec/ 72°C	34

Abb.2.1: PCR-Programm für Id1, Id2, Id3 und Sky. Die initiale Denaturierung fand bei 95°C für 3 min und die terminale Elongation bei 74°C für 5 min statt.

2.5.1 Verdünnungsreihen

In einigen Telexperimenten wurde zur Polymerasekettenreaktion nicht nur die gewonnene cDNA (1:1) eingesetzt, sondern parallel dazu auch 1:5- und 1:25igfache Verdünnungen derselben. Grund dafür war die Annahme, dass bei quantitativ weniger cDNA in den Verdünnungen nicht im Sättigungsbereich der verwendeten Enzyme gearbeitet würde. Mögliche Unterschiede zwischen Proben nach der PCR zeigen sich deutlicher, und so könnte ebenfalls besser auf eventuelle Differenzen im mRNA-Gehalt geschlossen werden. Zur Herstellung der 1:5-Verdünnungen wurden jeweils auf 1 μ l der cDNA 4 μ l aqua dest. gegeben, das Ganze gemischt und abzentrifugiert. Für die zweite Verdünnungsstufe (1:25) wurde auf 1 μ l der 1:5-Verdünnungen 4 μ l aqua dest. Gegeben, und so verfahren wie oben. Die Verdünnungen wurden ebenso wie die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.6 Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden im nächsten Schritt in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.6.1 Herstellung der Agarose-Gels und Probenauftrag

Eine Gelelektrophorese-Apparatur (Biometra, Göttingen) wurde zunächst mit 50xTAE-Puffer (Trisbase 242 g, Eisessig 57,1 ml, EDTA 0,5 M, pH 8,0 100 ml) gefüllt, die Gelträger abgedichtet und der benötigte Kamm mit den breiten Taschen hineingestellt. Zum Gießen des Gels (1 %ig) wurde nun 1 g Agarose (Agarose ultra pure, Invitrogen) in eine Schott-Glasflasche eingewogen und anschließend auf 100 ml mit 1xTAE Puffer aufgefüllt. Das Ganze wurde in einer Mikrowelle bei 90 Watt für circa 20 min aufgeköcht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Wenn die Agaroselösung nach Entnahme aus der Mikrowelle auf ungefähr 60°C abgekühlt war, wurde in das Gel 2 µl/100 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml, Roth) gegeben, das Gel in die Gelkammer gegossen und dort zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der organische Farbstoff Ethidiumbromid interkalierte zwischen den DNA-Basen-Paarstapeln. So machte er die Oligonukleotidbanden sichtbar, denn durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt, emittierte er selbst Licht im roten Bereich (590 nm).

Das auspolymerisierte Gel wurde nun mit 1xTAE-Puffer bedeckt, der Kamm vorsichtig gezogen und mit dem Auftrag der Proben begonnen. In jede Tasche kam ein Gemisch aus 15 µl des PCR-Produktes und 5 µl PCR-Ladungspuffer. Dieser war wie folgt zusammengesetzt:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 ml (Stammlösung 1 M)
1 mM Na ₂ -EDTA	200 µl (Stammlösung 0,5 M)
30% Glycerin	30 ml
0,1% SDS	500 µl (Stammlösung 20%)
0,0025% Bromphenolblau	62,5 µl (Stammlösung 4%)
aqua dest.	auf 100 ml

Zusätzlich wurde in eine separate Tasche ein 1 kb DNA-Längenstandard-Marker (Invitrogen) zur Molekulargewichtsbestimmung gegeben.

2.6.2 Gellauf und Auswertung

Der Gellauf erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA (Powergerät LKB 2103, Power Supply, Biochrom) und wurde beendet, wenn der Laufmarker Bromphenolblau etwa 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Nun wurde das Gel auf einem UV-Licht abgelegt und die Fluoreszenz der Ethidiumbromid-markierten Banden mit Hilfe eines Videokamera-basierten Computersystems aufgenommen und dokumentiert (Herolab, Wiesloch).

2.6.3 Ausmessung der Banden mit LabImage

Die im Agarosegel aufgetragenen PCR Produkte wurden nun mit dem Programm LabImage von Labsoft vermessen. Die Flächeninhalte der jeweiligen Banden, sowohl der Id-Proteine und Sky als auch der korrespondierenden β -Aktin-Werte, konnten so sehr genau bestimmt werden.

2.7. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Charakterisierung von Proteinen in zwei Schritten. Ein Proteingemisch wird zunächst auf einem hoch auflösenden SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese kann nun mit einem spezifischen Antikörper inkubiert werden, und erlaubt so die Identifizierung einzelner Proteine.

2.7.1 Proteinisolierung Zur Gewinnung des Proteinextraktes wurde aus den großen Gewebekulturflaschen zunächst das Medium abgekippt und diese dann zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Zum Ablösen der am Boden haftenden Zellen wurde pro Flasche 500 μ l Lysepuffer [150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 2 mM EGTA (pH 8,0), 10 mM Na-Pyrophosphat, 50 mM Na-Fluorid, 2 mM Na-orthovanadat, 1 % Triton-X-100, 10 μ g/ml Pepstatin, 10 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin, 200 μ M Pefa Bloc] gegeben und die lysierten Zellen dann mit einem Zellschaber geerntet. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden sie für 20 min auf Eis gelagert.

Danach wurde das Lysat für 15 min in einer Zentrifuge (Hettich Universal 30 RF) bei 15 000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Hierzu wurde das Lysat 1:10 verdünnt, dann jeweils 20 μ l der Verdünnung mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min im Dunkel stehen gelassen. Um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, wurden 3-fach Ansätze angefertigt. Mit einem Spekto-Photometer (Pharmacia LKB Ultraspec III) wurde nach Eichung mit Aqua dest. geeicht, die Emission der Proteingemische bei 595 nm und 465 nm gemessen. Anhand einer Standardkurve, die für Rinderserumalbumin ermittelt worden war, konnte nun mit Hilfe des Mittelwertes die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden.

2.7.3 Auftrennung der Proteine

2.7.3.1 Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Träger diente hier ein hochvernetztes Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden in wässriger Lösung, die SDS enthielt, aufgenommen. Dieses Detergens band an hydrophobe Reste der Proteine, verhinderte dadurch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen und maskierte sie mit einer negativen Ladung. Zusätzlich bewirkte die Zugabe von Mercaptoethanol die Spaltung von Disulfidbrücken, so dass Proteinkomplexe in Einzelbestandteile zerfielen. Die nun negativ geladenen Proteine wanderten in Richtung der positiven Elektrode, wobei die kleineren durch die Poren des Polyacrylamidgels am wenigsten behindert wurden und so der Kathode am nächsten kamen. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurde Sammel- und Trenngel angesetzt. Die Zusammensetzung war wie folgt:

	Sammelgel (5%ig)	Trenngel (12%ig)
RapidGel XL, Solution 40% (Amersham)	1,22 ml	6 ml
Trenngelpuffer; 1M Tris-HCl, pH 8,8	-	3,8 ml
Sammelgelpuffer; 2M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
Aqua dest.	6,2 ml	9,95 ml
SDS; 20%ig	50 µl	100 µl
APS; 10%ig	70 µl	140 µl
Temed	14 µl	20 µl

Abb.2.2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Mit Hilfe von Spacern wurde zwischen zwei Glasplatten Raum geschaffen und dort hinein das Trenngel zügig gegossen. Als es polymerisiert war, wurde darüber das Sammelgel gegossen, mit einem Kamm Taschen für die Proben geschaffen und dem Ganzen erneut Zeit zur Polymerisation gegeben. Die Gelkassette wurde dann mit Laufpuffer [25 mM Tris-Base, pH 8,8; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS] gefüllt und die Proteine zum Auftrag vorbereitet. Die Proteine wurden mit der gleichen Menge SDS-Ladungspuffer [65 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,01% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol; 10% Glycerol; 2% SDS] versetzt, für 5 min bei 95°C zum Denaturieren im Wasserbad inkubiert und dann in die Geltaschen pipettiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Standardmarker (Rainbow Markers, AmershamMW, Cruz MarkerTM MW Standards, Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt. Bei einer oberen Spannungsbegrenzung von 200V liefen die Gele mit konstantem Strom (PS 500 XT DC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) bei einer Stromstärke von 30 mA pro Gel bis die Bromphenolblau-Bande unten aus dem Gel ausgetreten war.

2.7.3.2 Das Blotten

Wenn der Gellauf beendet war, konnte das Gel vorsichtig aus der Apparatur genommen werden und mit einem Skalpell das Sammelgel von dem Trenngel geschnitten und verworfen werden. Dann wurden pro Gel je 6 Blätter Filterpapier in dessen Größe zu Recht geschnitten und ebenso wie das Trenngel für mindestens 10 min in Transferpuffer [125 mM Tris-base; 192 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v)] gelegt. Eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C super, Amersham Life Science) in derselben Größe wurde in aqua dest. eingeweicht. Die Kammer der Wet-Blot-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) wurde mit Transferpuffer gefüllt und dann die Transferkassette bestückt. Auf 3 Lagen Filterpapier wurde zunächst das Gel, die Nitrozellulosemembran und dann wiederum 3 Lagen Filterpapier geschichtet.

Zuletzt wurde das Ganze durch zwei in aqua dest. getränkte Schwämme stabilisiert, die Kassette verschlossen und unter Beachtung der Stromrichtung in die Wet-Blot-Apparatur gegeben. Unter Kühlung (6°C) lief der Blot über Nacht bei konstanter Spannung (10 V) mit einer Stromstärkenbegrenzung (400 mA). Nach einem erfolgreichen Elektrottransfer war am nächsten Tag der Rainbow-Marker auf der Membran sichtbar, und die Proteine hafteten über eine nicht-kovalente Wechselwirkung an der Nitrozellulosemembran.

2.7.4 Antikörperinkubation

Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in eine Blocking-Lösung gegeben, um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Hierzu wurde eine Lösung aus 5 % Magermilchpulver gelöst in PBS-T [1xPBS Puffer (Invitrogen), 20 % Tween 20] verwendet. Zum Nachweis der Id-Gene Id1, Id2 und Id3 wurden polyklonale Id1-, Id2- und Id3-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) und für β -Aktin ein polyklonaler β -Aktin-Antikörper benutzt. Das beste Ergebnis ließ sich bei allen vier Proteinen mit einer Inkubation der Membran in einer 1:500 Verdünnung der Antikörper erzielen. Zur Herstellung der Antikörper-Verdünnung wurde 1 % Magermilchpulver in PBS-T verwendet, die Membranen mit je 3 ml des Gemisches eingeschweißt und eine Stunde bei Raumtemperatur leicht schwenkend mit dem Primärantikörper inkubiert. Danach wurden sie drei Mal gründlich in PBS-T gewaschen.

Als sekundärer Antikörper diente der polyklonale anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) für die Id-Proteine und für β -Aktin ein polyklonaler anti-mouse-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology). Die Inkubation erfolgte analog wie oben in einer 1:2000 Verdünnung in 1 % Magermilch in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Membranen erneut gründlich in einer großen Menge PBS-T drei Mal

gewissenhaft gespült, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen und so einen möglichst kontrastarmen Hintergrund zu schaffen.

2.7.5 Entwicklung des Bildes

Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde ECL (Amersham) verwendet, eine nicht-radioaktive Nachweismethode, die auf Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern beruht. Durch die Umsetzung des Substrates wurde Licht emittiert. Zur Durchführung wurden auf jede Membran circa 3 ml ECL-Lösung gegeben, diese für eine Minute inkubiert, die Flüssigkeit entfernt, in Ceranfolie eingewickelt und dann in einer Filmkassette ein Röntgenfilm (HyperfilmTM MP, Amersham Life Science) aufgelegt. Nach einer Expositionsdauer von 1 min., 5 min. und 15 min. wurde der durch die emittierten Strahlen geschwärzte Film entwickelt und fixiert. Die sichtbaren Banden konnten nun qualitativ ausgewertet werden.

2.8 Auswertung

Wenn bei der PCR die Taq-Polymerase bereits im Sättigungsbereich arbeitet, erscheinen bestehende Unterschiede auf mRNA-Ebene nicht mehr als große Unterschiede im PCR-Produkt. Um diesen Fehler weitestgehend auszugleichen, wurde anhand von standardisierten Aktin-Proben eine Eichkurve (Abb. 2.3.) erstellt. Alle mit Hilfe von LabImage gemessenen Flächeninhalte wurden anhand dieser Eichkurve korrigiert.

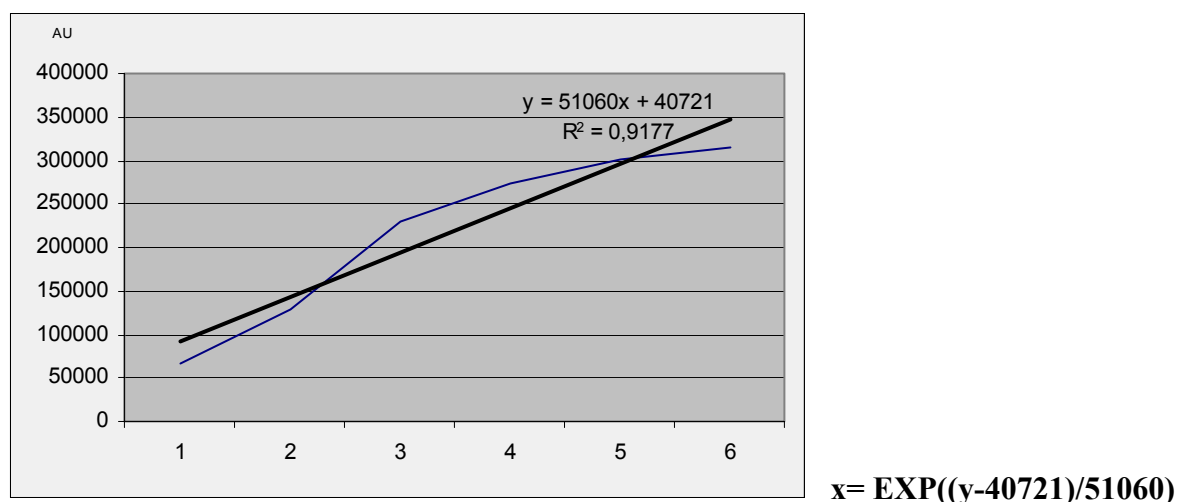


Abb. 2.3. Eichkurve zur Korrektur der PCR-Bandenstärke. Blaue Linie: aufgetragene Messwerte der 6 Aktin-Standards. Schwarze Linie: Ausgleichsgerade

Dann wurde ein Quotient aus den den jeweiligen Id-Proteinen beziehungsweise Sky zugehörigen Werten in den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen und dem jeweiligen Wert für Aktin gebildet. Dies ermöglichte auf einfache Weise die Werte mit dem House-keeping Protein

Aktin zu standardisieren und so die unterschiedlichen Bedingungen untereinander vergleichbar zu machen.

2.8.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des U-Mann-Whitney Tests. Dabei handelte es sich um einen nichtparametrischen Test für zwei nicht normalverteilte aber ordinale und metrische unabhängige Stichproben.

3. Ergebnisse

Für die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass sie den Knochenmorphogenesefaktor BMP-2 exprimiert und mit seinen für die Signaltransduktion entscheidenden Rezeptoren (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, ActR-IIA) ausgestattet ist. Mit Hilfe von Inkubationsversuchen sollte nun untersucht werden, in wie weit die Signalübertragung von BMP-2 durch unterschiedliche Faktoren moduliert werden kann.

Die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine wurde zunächst extern moduliert. Dazu wurde ein spezifischer Inhibitor der BMP-2 Wirkung extrazellulär verwendet.

3.1 Modulation der BMP-2 Wirkung durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA unter serumhaltigen Bedingungen

MCF-7 Zellen wurden mit rekombinantem BMP-2 und der rekombinant hergestellten extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors Typ IA (eBMPR-IA) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Für BMP-2 wurde bereits beschrieben, dass es eine hohe Affinität zu BMPR-IA hat, und so wurde eBMPR-IA gleichsam als extrazellulärer Inhibitor verwendet. Als Indikatoren für die Wirkung der beiden Substanzen wurde die Expression der Helix-loop-Helix Proteine Id1, Id2 und Id3 mittels RT-PCR analysiert.

3.1.1 Inkubation mit einer Konzentration von 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA

Die MCF-7 Zellen wurden für 4 h mit einer Konzentration von 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert, da eBMPR-IA und BMP-2 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 miteinander wechselwirken. Parallel dazu wurde je eine weitere Kulturflasche sowohl mit BMP-2 als auch mit eBMPR-IA in oben genannten Konzentrationen inkubiert und eine vierte Flasche wurde als serumhaltige Kontrolle ohne Inkubation mitgeführt.

Die Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Id-spezifischen PCR-Produkte findet sich in Abb. 3.0.

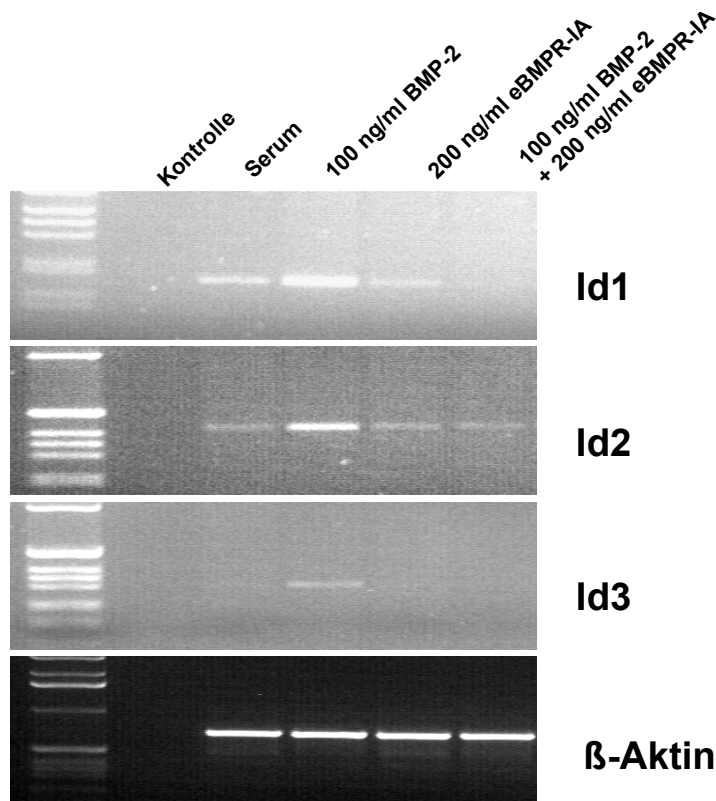


Abb. 3.0: Induktion von MCF-7 mit BMP-2 und eBMPR-IA und Nachweis von Id1, Id2 und Id3 und β-Aktin als Kontrolle mittels RT-PCR

Um eine genauere Aussage über signifikant erhöhte oder erniedrigte mRNA-Level treffen zu können, wurde in allen Proben die Intensität der Banden als Maß für den mRNA-Gehalt densitometrisch bestimmt (Kap. 2.8). Die so gewonnenen Werte wurden mit Hilfe einer Eichkurve korrigiert und anschließend auf den jeweiligen ebenfalls korrigierten Aktin-Wert bezogen. Dies erlaubte einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

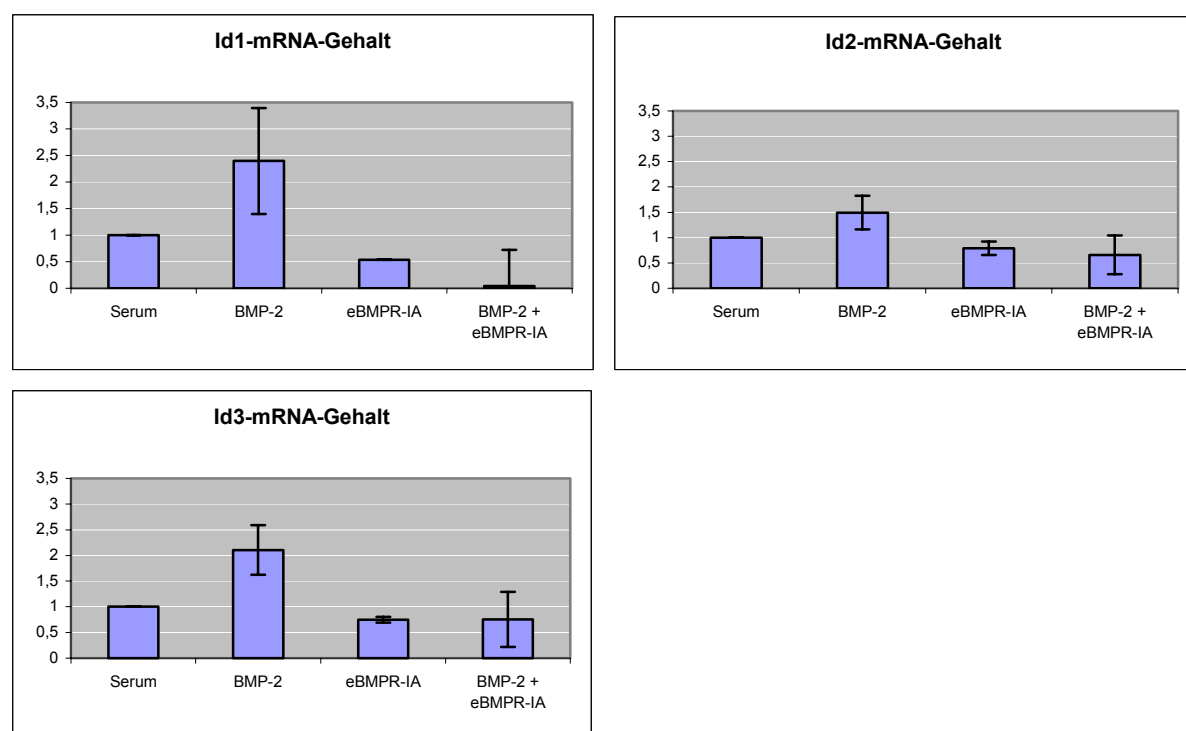
Veränderungen gegenüber der ohne Inkubation mitgeführten serumhaltigen Probe konnten ermittelt werden, in dem aus den auf den β-Aktin-mRNA-Gehalt gemittelten Werten ein Quotient Q_1 wie folgend gebildet wurde:

$$Q_1 = \frac{\text{mRNA-Level in Arbitrary Units der Zellen mit Inkubation}}{\text{mRNA-Level in Arbitrary Units der Zellen ohne Inkubation}}$$

Bei einer Zunahme des mRNA-Gehaltes in der inkubierten Kultur gegenüber der serumhaltigen Kontrollkultur ergab sich ein $Q > 1$, wohingegen ein $Q < 1$ für eine Verringerung des mRNA-Gehaltes durch die Inkubation sprach. Ein Quotient $Q = 1$ sprach für keinen messbaren

Unterschied zwischen dem mRNA-Level der inkubierten Kultur im Vergleich zur Kontrollkultur.

Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren, wurde der Versuch unter den gleichen Bedingungen zwei Mal wiederholt, wobei auch in der einzelnen Versuchsreihe die Polymerasekettenreaktion mehrfach durchgeführt wurde. Aus den korrigierten Werten der jeweiligen Versuche wurden dann die geometrischen Mittelwerte gebildet. Diese waren in diesem Fall dem arithmetischen Mittel überlegen, da es sich bei den Werten für Q um Verhältniszahlen handelte und diese somit nicht symmetrisch verteilt waren. Auch die Standardabweichungen wurden berechnet. Die auf diese Weise für die 4-stündige Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA gewonnenen Werte finden sich in Abb. 3.1.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1	Id2-mRNA	STABW Id2	Id3-mRNA	STABW Id3
Serum	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
BMP-2	2,39	1,00	1,49	0,33	2,11	0,48
eBMPR-IA	0,54	0,00	0,79	0,13	0,75	0,06
BMP-2 + eBMPR-IA	0,04	0,68	0,66	0,38	0,76	0,54

Abb. 3.1: Id-mRNA-Gehalt in Arbitrary Units bei der Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA unter serumhaltigen Bedingungen. n=3

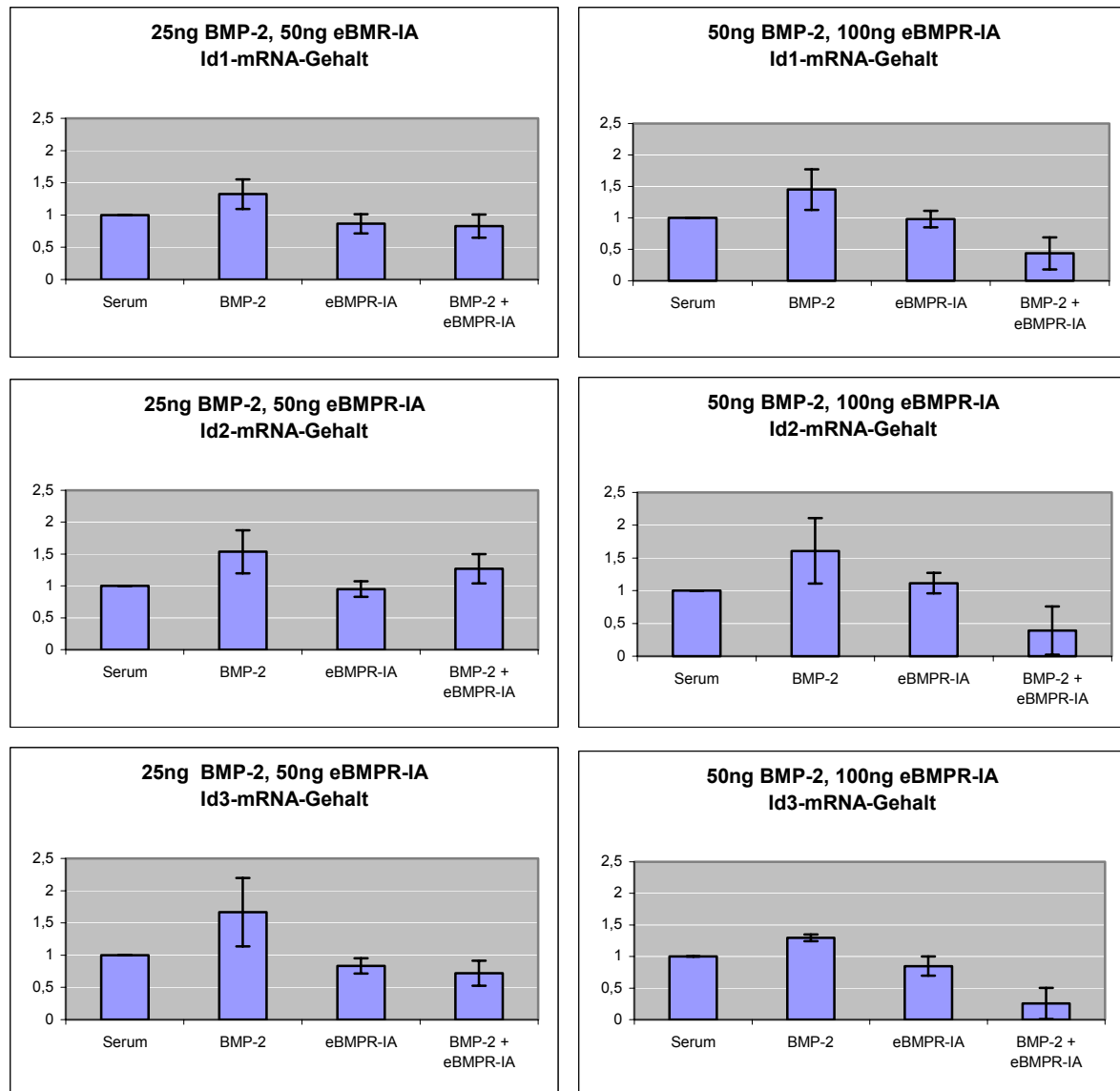
Dabei ergab sich durch die Inkubation mit BMP-2 für Id1 eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes auf über das Doppelte im Vergleich zur serumhaltigen Kontrollkultur. Die extrazelluläre Domäne des Typ-I-Rezeptors eBMPR-IA führte zu einer mRNA-Reduktion auf 54 % und die

Inkubation mit beiden Faktoren zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Expression von Id1. Bei der Id2-mRNA bewirkte BMP-2 eine Steigerung um 49 %, eBMPR-IA verminderte den mRNA-Gehalt um 21 % und beide zusammen reduzierten den Gehalt der mRNA auf 66 %. Für die Id3-mRNA bedeutete die BMP-2 Inkubation eine Zunahme auf das 2,1-fache, während eBMPR-IA das Level um 25 % senkte und beide Faktoren zusammen das Level ebenfalls um 25 % senken konnten.

Die Ergebnisse bestätigten, dass eine Inkubation mit BMP-2 für alle Id-Proteine zu einer Induktion auf mRNA-Ebene führte. eBMPR-IA hingegen bewirkte bei alleiniger Gabe in allen Fällen eine Senkung der Id-mRNA-Expression gegenüber der Kontrollkultur. Bei gleichzeitiger Gabe der beiden Substanzen konnte eBMPR-IA den BMP-2 Effekt deutlich inhibieren.

3.1.2 Inkubation mit einer Konzentration von 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA und einer Konzentration von 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA

Als nächster Schritt wurde überprüft, in wie weit die Konzentration der rekombinanten Proteine einen Einfluss auf die Modulation der mRNA-Niveaus hatte. So wurde mit abgestuften Konzentrationen untersucht, ob BMP-2 und eBMPR-IA dosisabhängige Wirkungen hatten. Die Versuchsdurchführung änderte sich hierfür nicht, das heißt die Inkubation fand wiederum für 4 h unter serumhaltigen Bedingungen statt, und eine serumhaltige Kontrollkultur wurde mitgeführt. Inkubiert wurde mit einer Konzentration von 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA oder mit 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA. Die Agarosegele wurden densitometrisch ausgemessen und nach der Eichkurve korrigiert (2.8). Aus den auf gleichem β -Aktin-Niveau gemittelten Werten wurde dann der Quotient Q gebildet (3.1.1). Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren, wurde auch hier der Versuch unter den gleichen Bedingungen zweimal wiederholt, wobei auch in der einzelnen Versuchsreihe die Polymerasekettenreaktion mehrfach durchgeführt wurde. Aus den korrigierten Werten der jeweiligen Versuche wurden dann die geometrischen Mittelwerte gebildet. Auch die Standardabweichungen wurden berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1	Id2-mRNA	STABW Id2	Id3-mRNA	STABW Id3
Serum	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
BMP-2 (25 ng/ml)	1,33	0,23	1,53	0,34	1,67	0,53
eBMPR-IA (50 ng/ml)	0,86	0,15	0,95	0,12	0,83	0,12
BMP-2 + eBMPR-IA	0,83	0,18	1,27	0,23	0,72	0,19

Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1	Id2-mRNA	STABW Id2	Id3-mRNA	STABW Id3
Serum	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
BMP-2 (50 ng/ml)	1,45	0,32	1,61	0,50	1,30	0,05
eBMPR-IA (100 ng/ml)	0,98	0,13	1,11	0,16	0,85	0,15
BMP-2 + eBMPR-IA	0,44	0,25	0,39	0,37	0,26	0,25

Abb. 3.2: Id-mRNA-Gehalt nach Inkubation mit 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA und 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA unter serumhaltigen Bedingungen. jeweils n=2

Sowohl die Inkubation mit 25 ng/ml BMP-2 als auch die Inkubation mit 50 ng/ml BMP-2 führte in allen Versuchen zu einer Erhöhung des mRNA-Gehaltes von Id1, Id2 und Id3. Dies bestätigte die Ergebnisse der Inkubationen mit 100 ng/ml. Die Stärke der Induktion der Id-

mRNA schien sich bei den unterschiedlichen Konzentrationen nicht deutlich zu unterscheiden. Es zeichnete sich ein Trend ab, dass bei niedrigeren Konzentrationen die Induktion weniger stark ausfällt (für Id1: bei 100 ng/ml: um 139 %, bei 50 ng/ml: um 45 %, bei 25 ng/ml: um 33 %), aber auch hier gab es Schwankungen innerhalb der verschiedenen Id-Proteine. Von größerer Bedeutung war die Aussage, dass es bei allen eingesetzten Konzentrationen von BMP-2 zu einer deutlichen Induktion der Id-mRNAs kam. eBMPR-IA konnte für Id3 sowohl mit 50 ng/ml als auch mit 100 ng/ml das mRNA-Niveau deutlich vermindern. Ebenso ließ sich bei Id1 durch 50 ng/ml der mRNA-Gehalt sichtlich senken. Noch eindrucksvoller waren die Ergebnisse, die bei gleichzeitiger Inkubation mit beiden Substanzen zu erzielen waren. Bis auf Id2, wo bei der Konzentrationskombination von 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA keine gute Inhibition erreicht werden konnte, wurde für alle 3 Id-Proteine in allen drei Konzentrationskombinationen bei gleichzeitiger Gabe von BMP-2 und eBMPR-IA der BMP-2 Effekt vollständig inhibiert und zusätzlich eine deutliche Reduktion des Gehaltes an Id-mRNA erreicht.

3.1.2.1 Untersuchung der Modulation der Wirkung auf die Rezeptortyrosinkinase Sky bei einer Inkubation von 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA

Es wurden auch Proteine aus anderen Proteinfamilien untersucht, um sicher zu gehen, dass es sich bei dem durch BMP-2 und eBMPR-IA induzierten Effekt nicht um ein Id-spezifisches Phänomen handelte. So wurde für die Rezeptortyrosinkinase Sky überprüft, ob die BMP-2 Wirkung dessen mRNA-Gehalt moduliert. Die cDNA aus oben genanntem Versuch wurde erneut verwendet, nur wurden jetzt ein spezifische Primer für Sky in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Für die wiederum auf β -Aktin gemittelten Sky-mRNA-Level bedeutete dies eine Induktion durch BMP-2 um 57 %. eBMPR-IA verringerte den mRNA-Gehalt um 12 % und beide Substanzen zusammen bewirkten eine Verminderung um 15 %. Die genannten Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt.

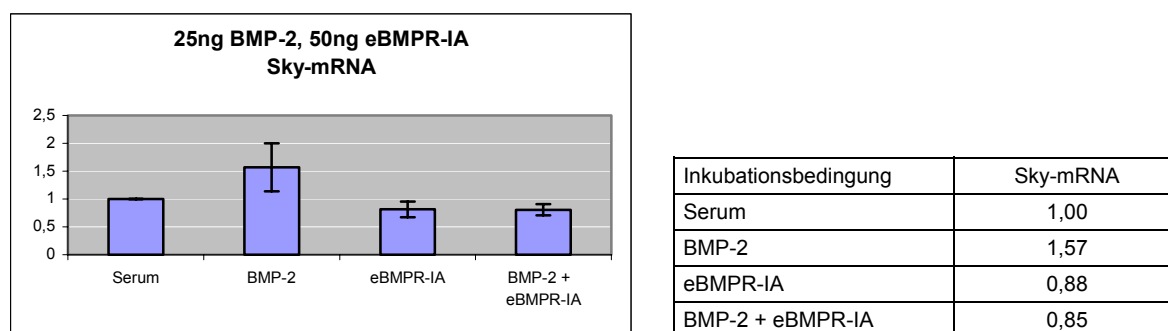


Abb. 3.3: Sky-mRNA-Gehalt in Arbitrary Units nach Inkubation mit 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA unter serumhaltigen Bedingungen; n=2

Da das Sky-mRNA-Level merklich beeinflusst worden war, wurde das Genprodukt in den zukünftigen Inkubationsversuchen mitberücksichtigt.

3.1.3 Inkubation mit 100ng/ml BMP-2 und 200ng/ml eBMPR-IA für 24h

Um zu überprüfen, ob die Inkubationszeit einen Einfluss auf Transkriptionsinduktion oder -repression hatte, wurden die Versuchsbedingungen diesbezüglich verändert. Der Inkubationsversuch mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA wurde unter einer auf 24 h verlängerten Inkubationszeit wiederholt. Ansonsten wurde verfahren wie in 2.8 und 3.1.1 beschrieben. Der mRNA-Gehalt ist in Abb. 3.4 dargestellt.

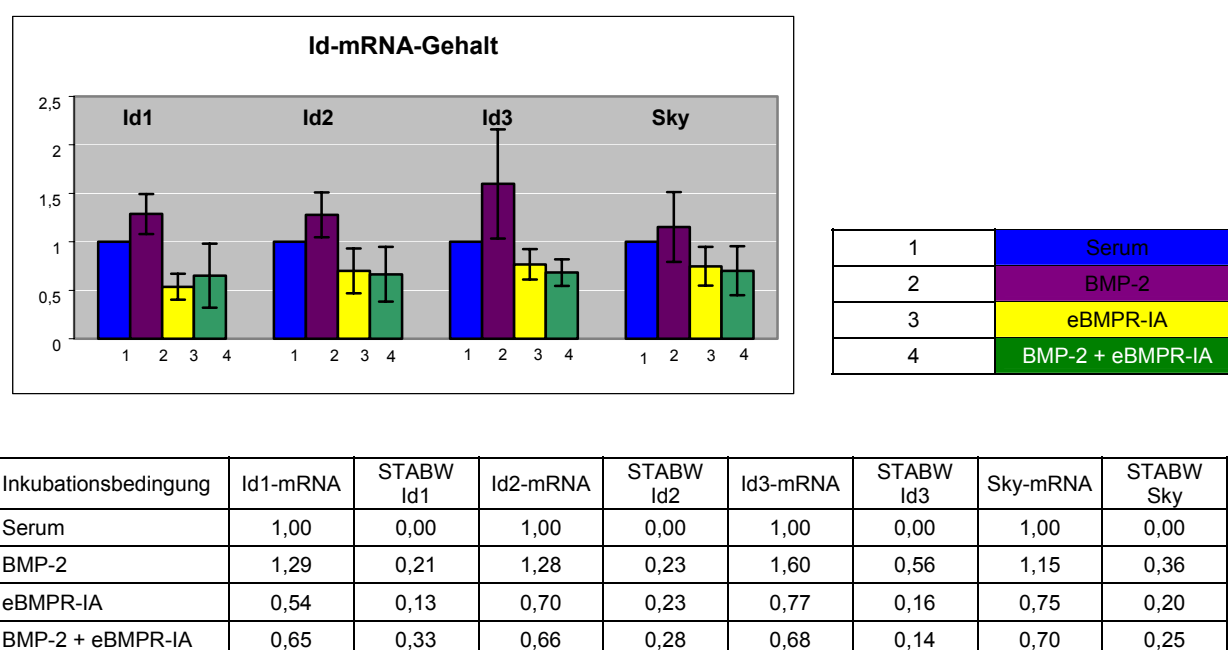


Abb. 3.4: mRNA-Gehalt der Id-Proteine und Sky nach 24 stündiger Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA unter serumhaltigen Bedingungen. n=2

Die BMP-2 Wirkung auf die Id-Proteine und Sky auf mRNA-Ebene war mehr oder weniger einheitlich. Die mRNA-Level wurden jeweils hoch reguliert, bei Id1 um 29 %, bei Id2 um 28 % und bei Id3 um 60 %. Bei der Sky-mRNA kam es mit 15 % zwar nur zu einer schwachen Induktion, dennoch entspricht der Trend dem der Id-Proteine. Die extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors senkte bei allen vier Proteinen das mRNA-Niveau, nämlich um 23 % bei Id3, um 25 % bei Sky, um 30 % bei Id2 und bei Id1 um 46 %. Auch der Einfluss bei

Zugabe beider Inkubationsfaktoren zur selben Zeit war auf die mRNA-Levels aller Proteine gleichartig. Es kam jeweils zu einer Abnahme des mRNA-Gehalts um 30-35 %.

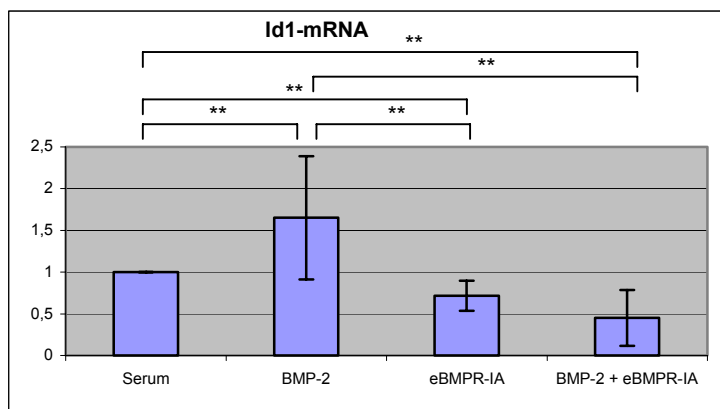
3.1.4 Zusammenfassung der Inkubationsversuche unter serumhaltigen Bedingungen

Fasste man alle Versuche unter serumhaltigen Bedingungen zusammen, so fanden sich zwar Abweichungen in der Stärke des jeweiligen Effektes, dennoch zeichneten sich einheitliche Trends ab (Abb. 3.5). Betrachtet wurden hier alle Versuche bei einer Inkubationszeit von 4 h. Unterschiedliche Inkubationskonzentrationen, sofern die 1:2 Stöchiometrie von BMP-2 zu eBMPR-IA eingehalten worden war, wurden außer Acht gelassen, weil die Auswertungen der einzelnen Teilversuche die Annahme nahe legten, dass keine deutlichen Unterschiede existierten. Die geometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet. Mittelwerte wurden in Form eines Balkendiagramms, die dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerindikatoren dargestellt.

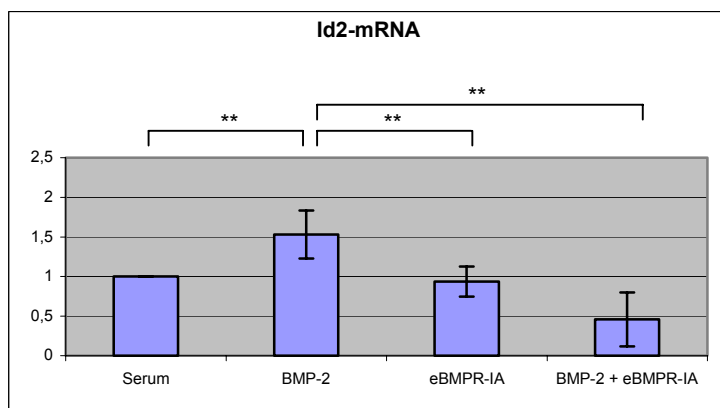
Für die durch BMP-2 und eBMPR-IA bedingten Veränderungen des Id-mRNA-Gehaltes gegenüber der nicht inkubierten Kontrollkultur unter serumhaltigen Bedingungen wurde untersucht, inwieweit sie zufallsbedingt waren oder Signifikanzen statistisch belegt werden konnten. Außerdem sollte ein Vergleich zwischen den einzelnen Inkubationsbedingungen untereinander hergestellt werden.

Mit Hilfe des U-Mann-Whitney-Tests, den man aufgrund der Stichprobe von $n=8$ dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben vorziehen musste, wurden die statistischen Signifikanzen ermittelt (graphische Darstellung in Abb. 3.5).

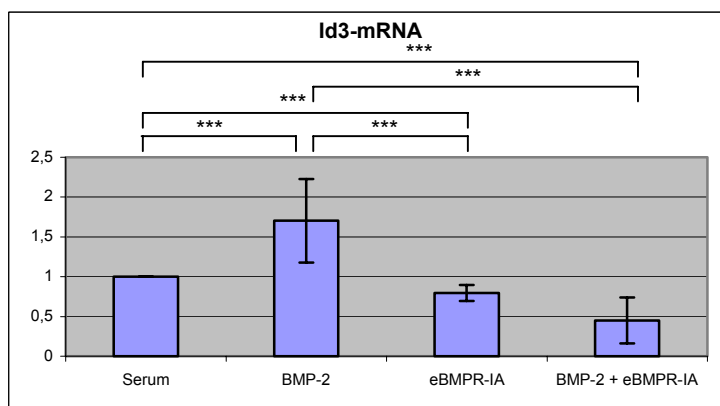
Für die drei Id-Proteine erwies sich die durch BMP-2 bedingte Induktion der Genexpression als hoch signifikant, im Falle von Id3 sogar als höchst signifikant. Auch die durch eBMPR-IA bewirkte Hemmung zeigte sich im Vergleich zur Inkubation mit BMP-2 in allen Fällen als hoch signifikant. Für Id1 und Id3 konnte man zusätzlich beobachten, dass auch die durch eBMPR-IA hervorgerufene Verminderung des mRNA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollkultur als statistisch signifikant erschien, was für eine effektive Hemmung endogen produzierten BMP-2s sprach. Sehr interessant war auch der Vergleich der alleinigen Inkubation mit BMP-2 mit der gleichzeitigen Gabe beider Inkubationsstoffe. Sowohl für Id1 als auch für Id2 und Id3 erwies sich dieser Unterschied als statistisch hoch signifikant, wodurch eine effektive Inhibition durch eBMPR-IA belegt wurde.



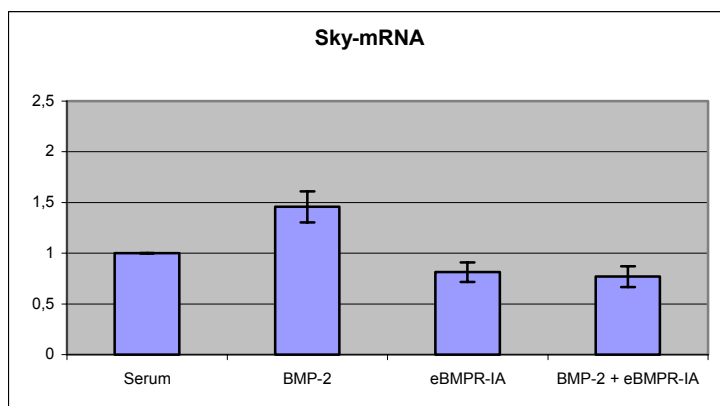
Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,65	0,74
eBMPR-IA	0,72	0,18
BMP-2 + eBMPR-IA	0,45	0,34



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,53	0,30
eBMPR-IA	0,93	0,19
BMP-2 + eBMPR-IA	0,46	0,34



Inkubationsbedingung	Id3-mRNA	STABW Id3
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,70	0,52
eBMPR-IA	0,80	0,09
BMP-2 + eBMPR-IA	0,45	0,29



Inkubationsbedingung	Sky-mRNA	STABW Sky
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,45	0,15
eBMPR-IA	0,81	0,09
BMP-2 + eBMPR-IA	0,77	0,10

Abb. 3.5: mRNA-Gehalt der Id-Proteine nach 4-stündiger Inkubation BMP-2 und eBMPR-IA unter serumhaltigen Bedingungen. Darstellung der statistischen Signifikanzen (U-Mann-Whitney-Test). *: $p = 0,05$; **: $p = 0,01$; ***: $p = 0,001$. $n=8$ für Id1, Id2 und Id3. $n=2$ für Sky.

Die Abweichungen im mRNA-Niveau für die Rezeptortyrosinkinase Sky wurden aufgrund des geringen Umfanges der Stichprobe nicht statistisch bestätigt. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass sich auch bei Sky nach Inkubation mit BMP-2 oder eBMPR-IA beziehungsweise beiden gemeinsam die gleichen Tendenzen zeigten wie zuvor bei den Id-Proteinen.

Es waren auch Unterschiede zwischen den einzelnen Id-Proteinen zu erkennen. Während die drei Id-Proteine alle ähnlich auf die Inkubation mit BMP-2 reagierten, zeigten sich bei alleiniger Inkubation mit eBMPR-IA erhebliche Unterschiede. Ebenso ließen sich bei gleichzeitiger Gabe beider rekombinanten Proteine unterschiedliche mRNA-Niveaus erkennen.

Ursächlich hierfür könnte sein, dass es sich bei Id1, Id2 und Id3 um unterschiedliche Gene handelt, obwohl sie alle zu den Helix-loop-Helix Proteinen gezählt werden. Es ist gut vorstellbar, dass sie durch verschiedene Signalwege reguliert werden.

3.1.5 Inkubation mit BMP-2 und eBMPR-IA bei Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Zum besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus des Knochenmorphogenesefaktors BMP-2 wurde in Vorversuchen getestet, ob die zeitlich versetzte Zugabe der beiden Substanzen einen Unterschied auf mRNA-Niveau bewirkte. Besonders interessant war hierbei, ob und wann die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine durch eBMPR-IA nicht mehr beeinflusst werden konnte (Abb. 3.6).

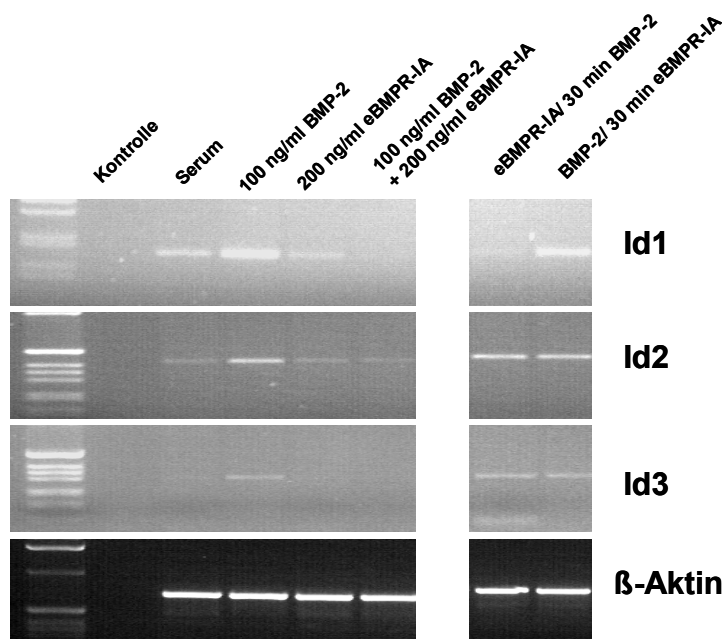


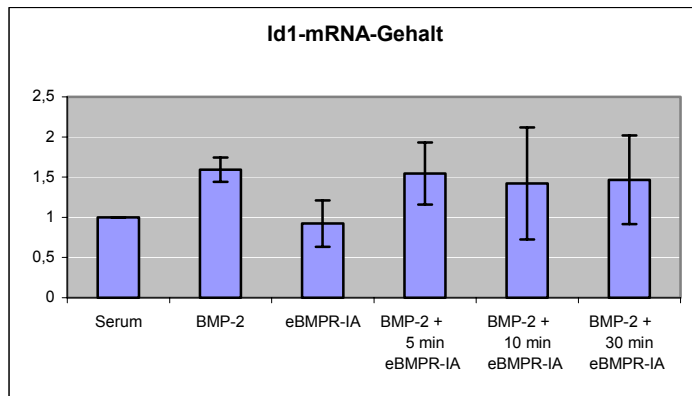
Abb. 3.6: Inkubation von MCF-7 mit BMP-2 und eBMPR-IA und Nachweis von Id1, Id2 und Id3 mittels RT-PCR. In den letzten beiden Banden: zeitlich versetzte Zugabe der beiden Substanzen.

Der linke Teil des Gels zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte wie bereits in 3.1.1 besprochen, während in den letzten beiden Spalten der Vorversuch dargestellt ist. In der vorletzten Spalte wurde zunächst mit 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert und nach 30 min 100 ng/ml BMP-2 hinzugefügt. In der letzten Spalte wurde entgegengesetzt verfahren, das heißt zuerst wurde mit BMP-2 inkubiert und nach 30 min eBMPR-IA in denselben Konzentrationen dazugegeben. Da sich schon in der optischen Auswertung ein Unterschied in Bezug auf den mRNA-Gehalt - insbesondere für Id1- zeigen ließ, wurden daraufhin weitere Versuchsanordnungen geplant (3.1.5.1, 3.1.5.2).

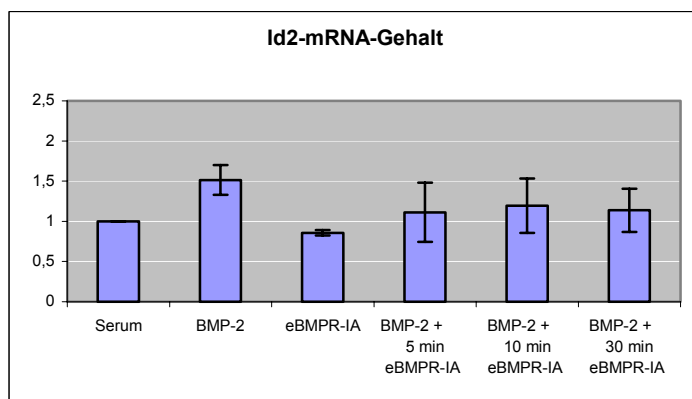
3.1.5.1 Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und dann Zugabe von 200 ng/ml eBMPR-IA nach 5 min, 10 min und 30 min

MCF-7 Zellen wurden wie in 3.1.1 mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert. Drei weitere Kulturflaschen wurden mit jeweils 100 ng/ml BMP-2 versetzt und zu diesen nach 5 min, 10 min und 30 min zusätzlich 200 ng/ml eBMPR-IA gegeben. Alle Zellen wurden insgesamt für eine Zeit von 4 h inkubiert. Die Induktion der MCF-7 Zellen wurde mittels RT-PCR von Id1, Id2 und Id3 nachgewiesen, wobei die PCR-Banden densitometrisch vermessen, korrigiert und auf β -Actin gemittelt wurden (siehe 2.8; 3.1.1). Die Ergebnisse sind in Form von Säulendiagrammen mit Fehlerbalken und tabellarisch in Abb. 3.7 dargestellt.

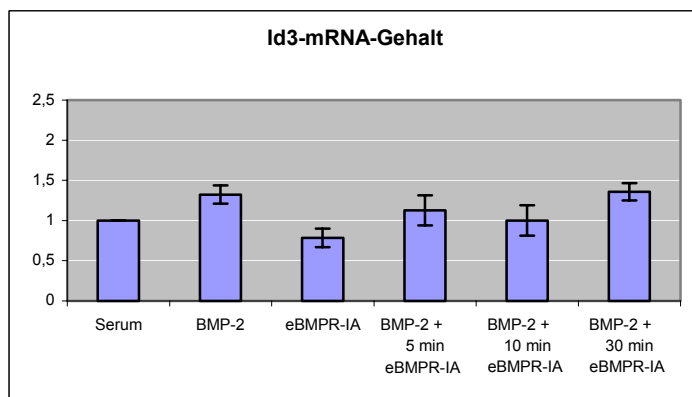
Für Id1 bedeutete die alleinige Inkubation mit BMP-2 eine Erhöhung des mRNA-Gehalts um 59%, eBMPR-IA alleine senkte den mRNA-Gehalt geringfügig um 8 %. Bei zeitlich versetzter Zugabe von eBMPR-IA nach vorheriger Gabe von BMP-2 kam es sowohl nach 5 min als auch nach 10 min und 30 min zu einer deutlichen Induktion der mRNA, nämlich um 54 %, 42 % und 47 %. Für die beiden anderen Helix-loop-Helix Proteine Id2 und Id3 ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 3.7). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass schon 5 Minuten nach Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 die Induktion der Id-mRNA durch die zusätzliche Gabe von 200 ng/ml eBMPR-IA nicht mehr inhibiert werden konnte. Besonders eindrucksvoll war dies bei Id1 zu beobachten, wo die Größe der Induktion nach Zugabe beider Substanzen im Bereich der Induktion von BMP-2 alleine lag. Aber auch für Id2 und Id3 zeigte sich in fast allen Fällen eine Erhöhung des mRNA-Levels trotz nachträglicher Gabe des Inhibitors.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,59	0,15
eBMPR-IA	0,92	0,29
BMP-2 + 5 min eBMPR-IA	1,54	0,39
BMP-2 + 10 min eBMPR-IA	1,42	0,70
BMP-2 + 30 min eBMPR-IA	1,47	0,55



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,51	0,18
eBMPR-IA	0,86	0,03
BMP-2 + 5 min eBMPR-IA	1,11	0,37
BMP-2 + 10 min eBMPR-IA	1,19	0,34
BMP-2 + 30 min eBMPR-IA	1,14	0,27



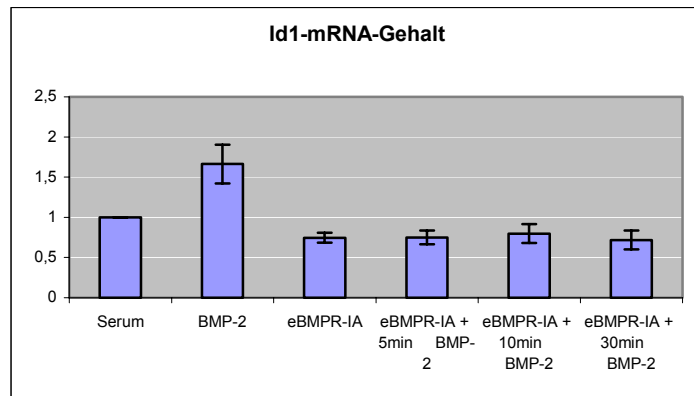
Inkubationsbedingung	Id3-mRNA	STABW Id3
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,32	0,11
eBMPR-IA	0,78	0,12
BMP-2 + 5 min eBMPR-IA	1,13	0,19
BMP-2 + 10 min eBMPR-IA	1,00	0,19
BMP-2 + 30 min eBMPR-IA	1,36	0,11

Abb. 3.7: Id-mRNA-Gehalt nach Induktion mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA und beiden Substanzen gemeinsam nach zeitlich versetzter Zugabe von eBMPR-IA. n=3

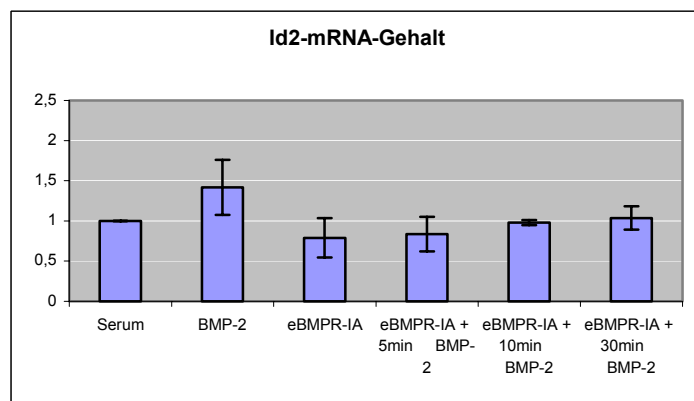
3.1.5.2 Inkubation mit 200 ng/ml eBMPR-IA und dann Zugabe von 100 ng/ml BMP-2 nach 5 min, 10 min und 30 min

Parallel zu den Versuchen unter 3.1.5.1 wurden weitere Kulturflaschen mit beiden Substanzen inkubiert, wobei jedoch diesmal die zeitliche Reihenfolge der beiden Proteine vertauscht war. Es wurde untersucht, ob und wie weit BMP-2 die Mammakarzinomzellen induzieren kann, wenn diese zuvor mit dem Inhibitor eBMPR-IA behandelt worden waren. So wurden drei weitere Kulturflaschen zunächst mit 200 ng/ml eBMPR-IA versetzt und ihnen nach 5 min, 10 min und 30 min 100 ng/ml BMP-2 hinzugefügt. Zum Vergleich wurden weitere Kulturflaschen mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 4 h und die Induktion wurde analog vorheriger Versuche mittels RT-PCR nachgewiesen und dann ausgewertet (2.8; 3.1.1)(Abb. 3.8).

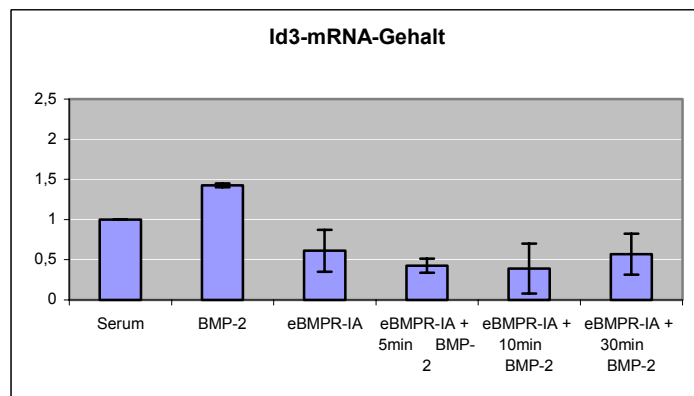
Parallel zu den vorherigen Versuchen (3.1.2) führte die Inkubation mit BMP-2 zu einer deutlichen Induktion der Id-mRNA und die alleinige Inkubation mit eBMPR-IA zu einer Reduktion des Id-mRNA Niveaus. Bei Zugabe beider Inkubationsstoffe, wobei mit eBMPR-IA stets vorinkubiert wurde und BMP-2 dann nach 5 min, 10 min und 30 min zugefügt wurde, ließ sich für alle drei Proteine eine eindeutige Inhibition der BMP-bedingten Induktion beobachten. Das heißt bei vorzeitiger Gabe von eBMPR-IA entfaltete dieser seine vollständige inhibitorische Wirkung. Sowohl für Id2 als auch für Id3 konnte bei Zugabe des BMP-2 nach 30 min beobachtet werden, dass der Id-mRNA-Gehalt wieder zunahm. Die Inhibition nach 30 min fiel weniger stark aus, als bei Zugabe nach 5 oder 10 min. Für die Id-2-mRNA bedeutete dies beispielsweise nach 30 min eine Steigerung des mRNA-Gehalts um 4 %. Ursache hierfür könnte eine Abnahme der Stabilität des eBMPR-IA sein. Es fielen weitere Unterschiede zwischen den einzelnen Id-Proteinen auf, ähnlich wie bei vorherigen Inkubationsversuchen (3.1.1, 3.1.2). Während es bei Id3 beispielsweise in allen Fällen zu einer deutlichen Abnahme des Id3-mRNA-Niveaus kam, war die bei Id1 zu beobachtende Inhibition lange nicht so groß. Diese Beobachtungen unterstützten wiederum sehr stark die Annahme, dass Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen den einzelnen Id-Proteinen existierten.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,66	0,24
eBMPr-IA	0,75	0,06
eBMPr-IA + 5 min BMP-2	0,75	0,09
eBMPr-IA + 10 min BMP-2	0,80	0,12
eBMPr-IA + 30 min BMP-2	0,72	0,12



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,42	0,34
eBMPr-IA	0,79	0,25
eBMPr-IA + 5 min BMP-2	0,83	0,22
eBMPr-IA + 10 min BMP-2	0,98	0,03
eBMPr-IA + 30 min BMP-2	1,04	0,14



Inkubationsbedingung	Id3	STABW Id3
Serum	1,00	0,00
BMP-2	1,42	0,02
eBMPr-IA	0,61	0,26
eBMPr-IA + 5 min BMP-2	0,43	0,09
eBMPr-IA + 10 min BMP-2	0,39	0,31
eBMPr-IA + 30 min BMP-2	0,57	0,25

Abb. 3.8: Id-mRNA-Gehalt nach Induktion mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPr-IA und beiden Substanzen gemeinsam nach zeitlich versetzter Zugabe von BMP-2. n=3

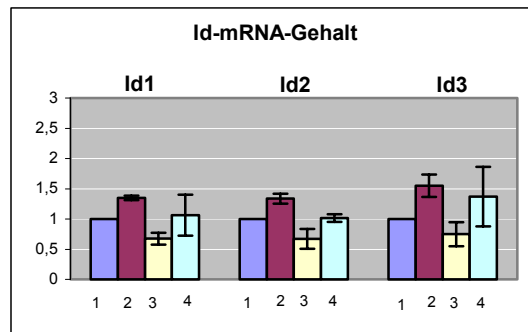
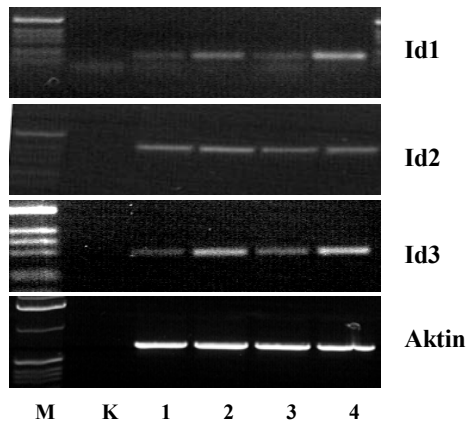
3.2 Modulation der BMP-2 Wirkung durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA unter serumfreien Bedingungen

Die Inkubationsversuche wurden unter serumfreien Bedingungen wiederholt, weil zum einen Hungerbedingungen möglicherweise zu anderen biologischen Effekten von BMP-2 respektive eBMPR-IA führten und zum anderen der Verlauf der BMP-2-abhängigen Id-Induktion unter diesen Bedingungen beschrieben wurde (Clement et al., 2000). Dabei wurden die MCF-7 Zellen in derselben Menge wie bisher ausgesät und über Nacht in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurden sie „serumfrei“ gemacht, was bedeutete dass sie gründlich mit PBS gewaschen und danach weitere 24 h in DMEM kultiviert wurden, aber diesmal ohne Zusatz von FCS. Ohne das Kälberserum fehlte den Zellen das Nährmedium.

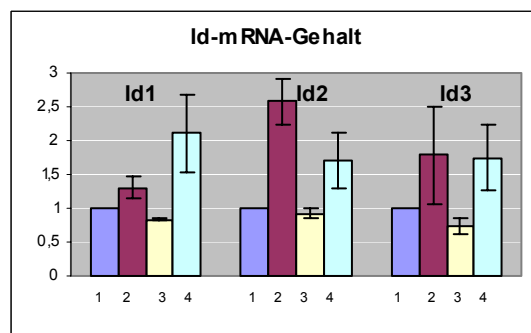
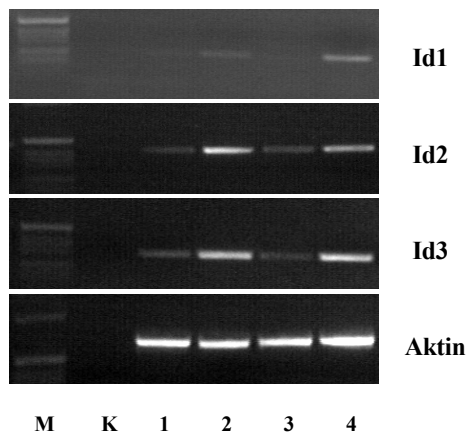
3.2.1 Modulation durch BMP-2 und eBMPR-IA in unterschiedlichen Konzentrationen unter serumfreien Bedingungen

Zum Vergleich mit den Inkubationen unter serumhaltigen Bedingungen wurden die Versuche mit exakt den gleichen Konzentrationen im serumfreien Medium wiederholt. Die MCF-7 Zellen wurden mit Konzentrationen von 25 ng/ml- 100 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml- 200 ng/ml eBMPR-IA für jeweils 4 h inkubiert, wobei die 1:2 Stöchiometrie von BMP-2 zu eBMPR-IA stets eingehalten wurde. Jeweils eine Kulturflasche wurde mit BMP-2 oder eBMPR-IA inkubiert und eine weitere mit beiden Faktoren gleichzeitig. Es wurde eine Kontrollkultur mit DMEM ohne FCS mitgeführt, deren Werte später als Referenzgröße im Vergleich mit den inkubierten Kulturen dienen sollten. Die mRNA-Gehalte der drei Id-Proteine nach 4-stündiger Inkubation wurden densitometrisch gemessen und nach der Eichkurve korrigiert (2.8). Die jeweils mitbestimmten β -Aktin-mRNA-Werte wurde mit den Id-mRNA-Werten ins Verhältnis gebracht (Id-mRNA-Gehalt/ β -Aktin-mRNA-Gehalt), um einen Vergleich der unterschiedlichen Proben auf gleichem Niveau zu ermöglichen. Um das Ausmaß des Inkubationseffektes zu erfassen, wurde der Quotient Q_1 gebildet (3.1.1). Aus den korrigierten Werten der jeweiligen Versuche wurde dann das geometrische Mittel gebildet und die Standardabweichungen berechnet (3.1.2). Die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte und die dazugehörigen Graphiken mit Fehlerbalken sind in Abb. 3.9 dargestellt:

Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA



Inkubation mit 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA



Inkubation mit 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA

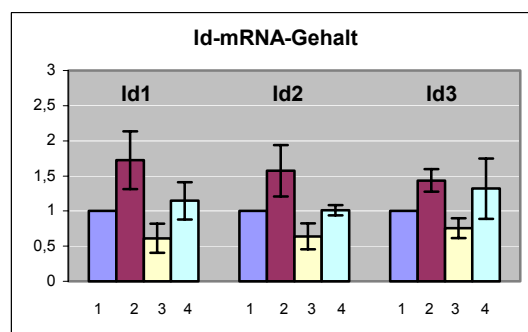
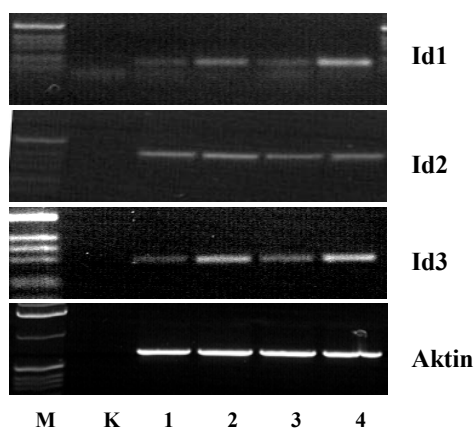


Abb. 3.9: Inkubation von MCF-7 mit BMP-2 und eBMPR-IA unter serumfreien Bedingungen und Nachweis von Id1, Id2 und Id3 mittels RT-PCR. M: Marker, K: Kontrolle, 1: serumfreie Kontrollkultur, 2: 100 ng/ml BMP-2, 3: 200 ng/ml eBMPR-IA, 4: 100 ng/ml BMP-2 + 200 ng/ml eBMPR-IA. n=3

3.2.1.1 Id1-mRNA-Gehalt

Bei der Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Id1-mRNA-Gehalts von 69 %. Auch bei den beiden niedrigeren Dosierungen von 50 ng/ml und 25 ng/ml bewirkte BMP-2 im Mittel eine Zunahme der Id-mRNA, die bei 30 % beziehungsweise bei 35 % lag. Durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors A kam es in allen Fällen zu einer klaren Reduktion des mRNA-Niveaus von Id1. Diese betrug 41 % bei einer Konzentration von 200 ng/ml eBMPR-IA, 17% bei 100 ng/ml und 32 % bei 50 ng/ml. Bei gleichzeitiger Inkubation mit beiden Faktoren war der Einfluss auf das mRNA-Level uneinheitlich. Zwar führte die Inkubation bei allen drei Konzentrationen zu einer Erhöhung des mRNA-Levels, jedoch variierte diese stark bei den unterschiedlichen Dosierungen. Sie lag bei Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA bei 12 %, bei 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA bei 11 % und bei 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA bei 6 %.

3.2.1.2 Id2-mRNA-Gehalt

Der Id2-mRNA-Gehalt war bei der Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 im Vergleich zum mRNA-Gehalt der Kontrollkultur um 55 % erhöht. Für 50 ng/ml BMP-2 ergab sich eine Zunahme des mRNA-Gehaltes um 158 % und für 25 ng/ml um 34 %. eBMPR-IA verringerte bei allen drei Konzentrationen das mRNA-Niveau und zwar bei absteigender Konzentration von 38 % über 8 % bis zu 33 %. Beide Faktoren gemeinsam hatten sowohl bei einer Konzentration von 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA als auch bei 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml eBMPR-IA keinen entscheidenden Einfluss auf das Id2-mRNA-Level im Vergleich zur Kontrollkultur ohne FCS. Die gleichzeitige Inkubation mit 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA führte zu einer deutlichen Induktion der Id2-mRNA um 70 %.

3.2.1.3 Id3-mRNA-Gehalt

Auch für das Protein Id3 bedeutete die Inkubation mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 analog zu Id1 und Id2 auf mRNA-Ebene eine klare Induktion der mRNA, die von 43 % bei 100 ng/ml BMP-2, über 79 % bei einer Konzentration von 50 ng/ml und 55 % bei 25 ng/ml BMP-2 reichte. Die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors Typ IA bewirkte in allen drei Konzentrationen eine Reduktion um ungefähr 26 %. Die parallele Inkubation mit beiden Substanzen führte beim Id3-mRNA-Gehalt zu einer jeweils eindeutigen Erhöhung der mRNA und zwar um 28 % bei 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA und 75 % beziehungsweise 37 % für die anderen beiden Konzentrationsverhältnisse.

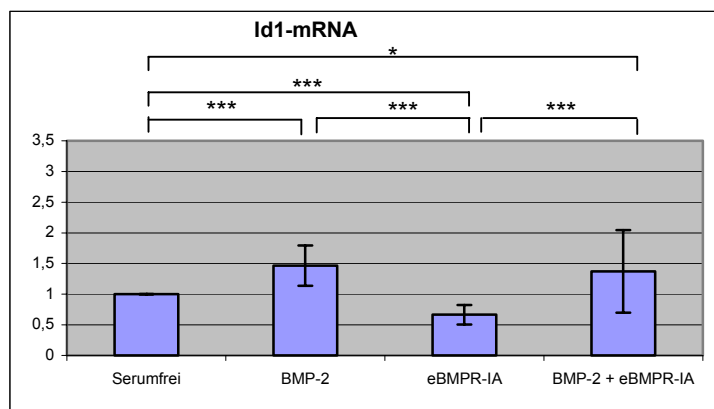
3.2.1.4 Überprüfung der Signifikanzen

Aufgrund des kleinen Umfangs der jeweiligen Stichprobe ($n=3$) konnte nicht der U-Mann-Whitney-Test zur Auswertung der Ergebnisse benutzt werden, und so wurde, um eine eher qualitative Aussage treffen zu können, für alle Mittelwerte von Q das 95 % Konfidenzintervall gebildet und überprüft, ob die durch BMP-2 und eBMPR-IA bedingten Veränderungen des Id-mRNA-Gehaltes gegenüber der nicht inkubierten Kontrollkultur unter serumfreien Bedingungen zufallsbedingt waren. Das heißt für die Werte $Q>1$ und $Q<1$ wurden 95 %-Konfidenzintervalle berechnet und geprüft, ob mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit α von 5 % die Werte eine statistisch signifikante Erhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollkultur bedeuteten.

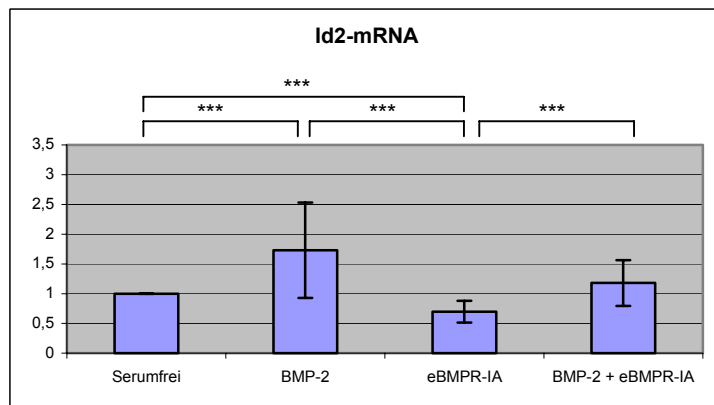
Für alle drei Id-Proteine Id1, Id2 und Id3 ließ sich die durch BMP-2 bedingte Induktion auf mRNA-Ebene als statistisch signifikant zeigen. Ebenso war die durch den Inhibitor eBMPR-IA bewirkte Hemmung auf mRNA-Niveau für alle drei Id-Proteine statistisch signifikant. Bei gleichzeitiger Gabe von BMP-2 und eBMPR-IA kam es überraschenderweise nicht wie erwartet zu einer Inhibition, wie sie unter serumhaltigen Bedingungen beobachtet wurde, sondern zu einer eindeutigen Induktion der Id-mRNA. Diese war zwar nur für Id3 mit Hilfe der beschreibenden Statistik statistisch signifikant, jedoch war sie für alle Id-Proteine wiederholt zu beobachten.

3.2.2 Zusammenfassung der Inkubationsversuche unter serumfreien Bedingungen

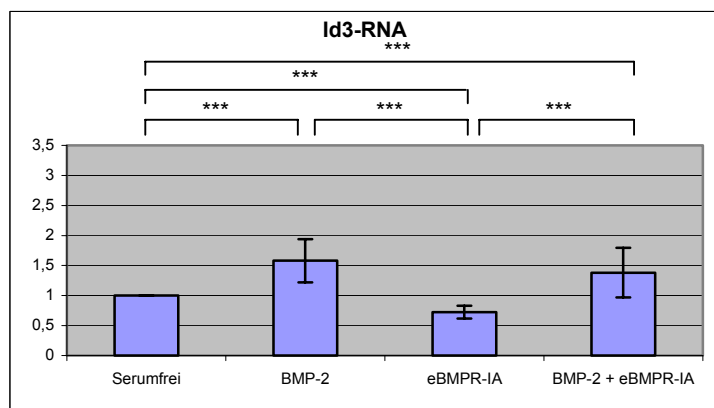
Analog zu den Versuchen unter serumhaltigen Bedingungen (3.1.4) wurden auch die Versuche in DMEM ohne FCS in einer Graphik beziehungsweise einer Tabelle zusammengefasst. Die geometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Werte von Q wurden berechnet und in Abb.3.8 als Balkendiagramme und Fehlerbalken dargestellt. Mit Hilfe von statistischen Methoden wurden dann die Veränderungen des jeweiligen mRNA-Gehaltes im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrollkultur überprüft. Für alle drei Id-Proteine erwies sich die durch den Wachstumsfaktor BMP-2 bedingte Induktion als statistisch signifikant. Ebenso wurde die durch die extrazelluläre Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors IA bewirkte Reduktion des mRNA-Gehaltes von Id1, Id2 und Id3 als statistisch signifikant bestätigt. Die gleichzeitige Inkubation beider Substanzen führte nur bei Id3 zu einer signifikanten Erhöhung des mRNA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollkultur. Alle genannten Ergebnisse sind in Abb. 3.10 dargestellt.



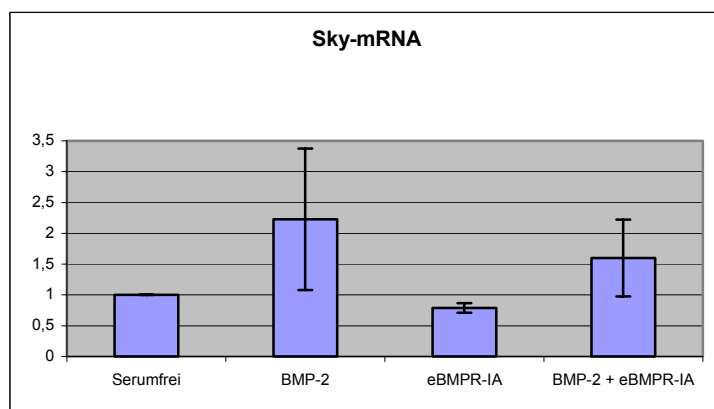
Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,47	0,33
eBMPR-IA	0,67	0,16
BMP-2 + eBMPR-IA	1,37	0,67



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,73	0,80
eBMPR-IA	0,70	0,18
BMP-2 + eBMPR-IA	1,18	0,38



Inkubationsbedingung	Id3-mRNA	STABW Id3
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,58	0,36
eBMPR-IA	0,73	0,11
BMP-2 + eBMPR-IA	1,38	0,41



Inkubationsbedingung	Sky	STABW Sky
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	2,23	1,15
eBMPR-IA	0,79	0,08
BMP-2 + eBMPR-IA	1,60	0,62

Abb. 3.10: mRNA-Gehalt der Id-Proteine nach 4-stündiger Inkubation BMP-2 und eBMPR-IA unter serumfreien Bedingungen. Darstellung der statistischen Signifikanzen (U-Mann-Whitney-Test). *: $p = 0,05$; **: $p = 0,01$; ***: $p = 0,001$. $n=7$ für Id1, Id2 und Id3. $n=3$ für Sky.

Für die durch BMP-2 und eBMPR-IA bedingten Veränderungen des Id-mRNA-Gehaltes gegenüber der nicht inkubierten Kontrollkultur wurde nun auch unter serumfreien Bedingungen untersucht, inwieweit sie zufallsbedingt waren oder aufgrund von Signifikanzen statistisch belegt werden konnten. Zusätzlich sollten die einzelnen Inkubationsbedingungen miteinander verglichen werden.

Aufgrund des Umfangs der Stichprobe mit $n=7$ für Id1, Id2 und Id3 wurde erneut der U-Mann-Whitney-Test gewählt und die statistischen Signifikanzen ermittelt (Abb. 3.10). Für alle drei Id-Proteine erwies sich die durch BMP-2 bedingte Induktion der Genexpression im Vergleich zur serumfreien Kontrollkultur als höchst signifikant. Des Weiteren bewirkte die Inkubation mit eBMPR-IA sowohl im Vergleich zur Kontrollkultur als auch im Vergleich zur Inkubation mit BMP-2 allein eine statistisch signifikante Verminderung des Gehalts an Id-mRNA bei allen drei Id-Proteinen. Dies spricht für eine ebenfalls effektive Hemmung der endogenen BMP-2 Wirkung unter serumfreien Bedingungen. Unerwarteterweise führte allerdings die gemeinsame Zugabe von BMP-2 und eBMPR-IA im Gegensatz zu den Ergebnissen unter serumhaltigen Bedingungen (3.1.4) bei Abwesenheit von FCS zu einer weiteren Induktion der Id-Proteine. Diese Induktion auf mRNA-Ebene erwies sich für Id1 und Id3 im Vergleich zur Kontrollkultur als signifikant, für alle drei Id-Proteine im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit eBMPR-IA als höchst signifikant, und Unterschiede zur alleinigen Inkubation mit BMP-2 ließen sich nicht weiter abgrenzen.

Die Abweichungen im mRNA-Niveau für die Rezeptortyrosinkinase Sky wurden auf Grund des geringen Umfangs der Stichprobe ($n=3$) nicht statistisch geprüft. Doch auch für Sky zeigten sich nach Inkubation mit BMP-2 oder eBMPR-IA beziehungsweise beiden gemeinsam ähnliche Tendenzen wie zuvor bei den Id-Proteinen.

3.2.4 Versuche unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen im Vergleich

Sehr interessant war nun die Frage, wie sich die Versuche bei Inkubation in DMEM mit 10 % FCS von denen bei Inkubation unter serumfreien Bedingungen unterscheiden. In den vorangegangenen Versuchen wurden die MCF-7 Zellen für 24 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert, um eine Art „Hungerzustand“ der Zellen hervor zu rufen. Es konnte schon mehrfach beobachtet werden, dass in diesem Falle Zellen entweder besonders deutlich oder aber auch völlig anders auf Inkubationsstoffe reagieren. Die mit Hilfe des U-Mann-Whitney-Tests gewonnenen vergleichenden Statistiken sind in der Abbildung 3.11. in einer Grafik dargestellt.

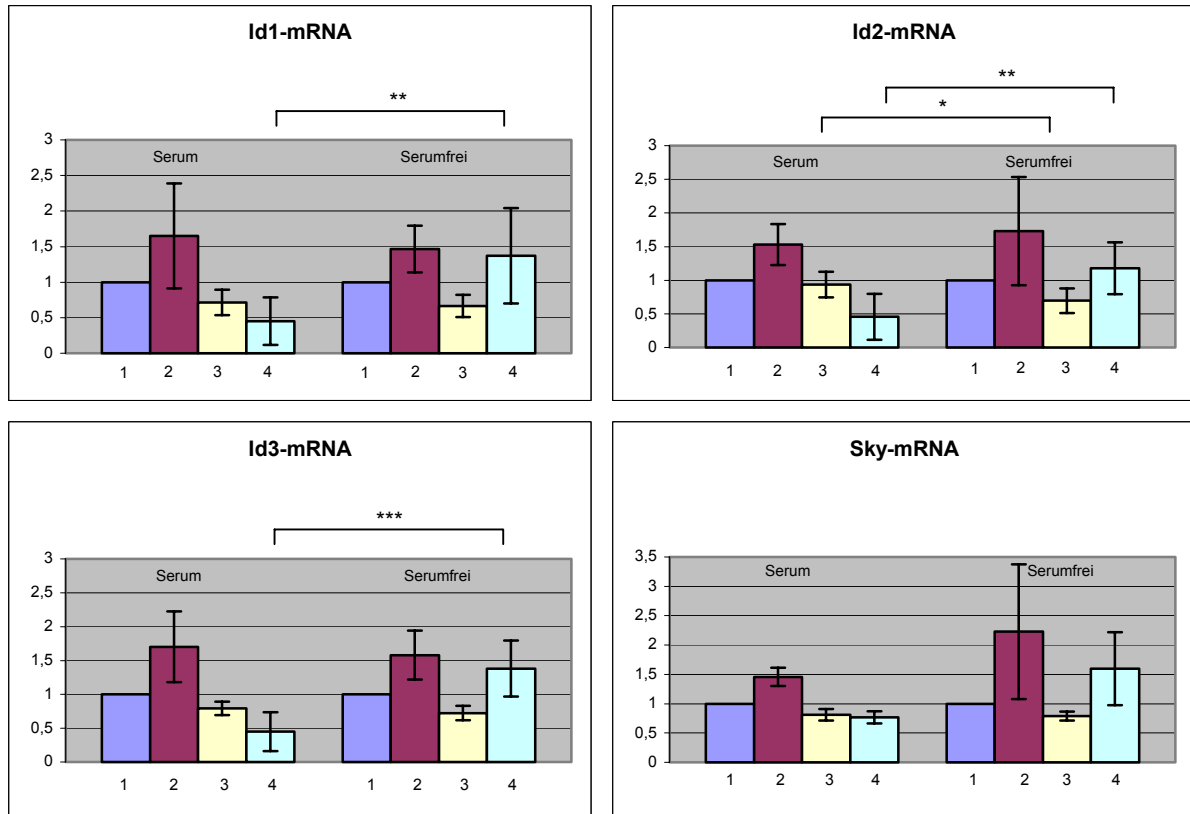


Abb. 3.11: Inkubationsversuche mit BMP-2 und eBMPR-IA in DMEM mit 10 %FCS (Serum) und DMEM ohne FCS (Serumfrei) im Vergleich. Darstellung der statistischen Signifikanzen (U-Mann-Whitney-Test). *: $p = 0,05$; **: $p = 0,01$; ***: $p = 0,001$. $n=8$ für Id1, Id2, Id3 (Serum), $n=7$ für Id1, Id2, Id3 (Serumfrei). Für Sky $n=2$ (Serum, Serumfrei).

Zog man einen Vergleich zwischen den Inkubationsversuchen unter serumhaltigen Bedingungen mit den Versuchen unter serumfreien Bedingungen, so zeigte sich für alle drei Id-Proteine ein jeweils hoch oder höchst signifikanter Unterschied bei gleichzeitiger Gabe von BMP-2 und eBMPR-IA. Dies lag an der unerwarteten starken Induktion beziehungsweise dem Wegfall der Hemmung unter serumfreien Bedingungen bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen. Außerdem konnte sich, allerdings nur für Id2, zeigen, dass bei Inkubation unter serumfreien Bedingungen der Effekt von eBMPR-IA statistisch signifikant deutlicher ausgeprägt war als unter serumhaltigen Bedingungen. Dies stand in Einklang mit der Erwartung, dass die MCF-7 Zellen, die ohne das Kälberserum für 24 h in eine Art Hungerzustand versetzt worden waren, deutlicher auf externe Stimuli reagieren. Für die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine ließen sich keine signifikanten Unterschiede beobachten. Zwar fiel insbesondere für Sky die durch BMP-2 bedingte Induktion unter serumfreien Bedingungen deutlich intensiver aus, jedoch ließ sich dieses aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch analysieren.

3.2.5 Vergleich zwischen Id1, Id2 und Id3

Die statistische Analyse erlaubte auch einen Vergleich zwischen den einzelnen Id-Proteinen. In Bezug auf die Induktion durch BMP-2, die Hemmung durch eBMPR-IA oder die gemeinsame Inkubation mit BMP-2 und eBMPR-IA ließen sich weder unter serumhaltigen noch unter serumfreien Bedingungen markante Unterschiede erkennen (Grafiken nicht dargestellt).

3.3 Intrazelluläre unspezifische Modulation der BMP-2 Wirkung

Im Gegensatz zu der bisher durchgeführten extrazellulären spezifischen Modulation mit Hilfe von eBMPR-IA wurde im Folgenden versucht, die BMP-2 Wirkung intrazellulär zu beeinflussen. Dies wurde mit Hilfe von unspezifischen Inhibitoren der Transkription und der Translation erreicht.

3.3.1 Inkubation mit Actinomycin D

Um zu sehen, in wie weit eine Modulation auf Transkriptionsebene die Effekte von BMP-2 und eBMPR-IA auf die Id-Expression beeinflussen konnte, wurde mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D inkubiert. Die Versuchsdurchführung war den anderen Versuchen unter serumfreien Bedingungen entsprechend (3.2). Zusätzlich wurden alle Kulturflaschen für 15 min mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml Actinomycin D vorinkubiert. Wiederum wurde eine Kontrollkultur mitgeführt, die später als Vergleich für das Ausmaß des Effektes der unterschiedlichen Inkubationsstoffe auf das Id-mRNA-Level diene. Diese wurde ebenfalls mit Actinomycin D vorbehandelt. Bei diesem Versuchsansatz wurde in Anlehnung an Daten aus der Literatur eine Inkubationszeit von 6 h gewählt (Ogata et al., 1994).

Die Kulturflaschen wurden mit 100 ng/ml BMP-2, 200 ng/ml eBMPR-IA oder beidem zugleich für jeweils 6 h inkubiert. Damit die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen untereinander vergleichbar waren, wurde jeweils neben den mRNA-Leveln von Id1, Id2 und Id3 das β -Aktin mRNA-Level mitbestimmt. Aus denen auf β -Aktin gemittelten Werten wurde dann der Quotient Q_1 gebildet (3.1.1).

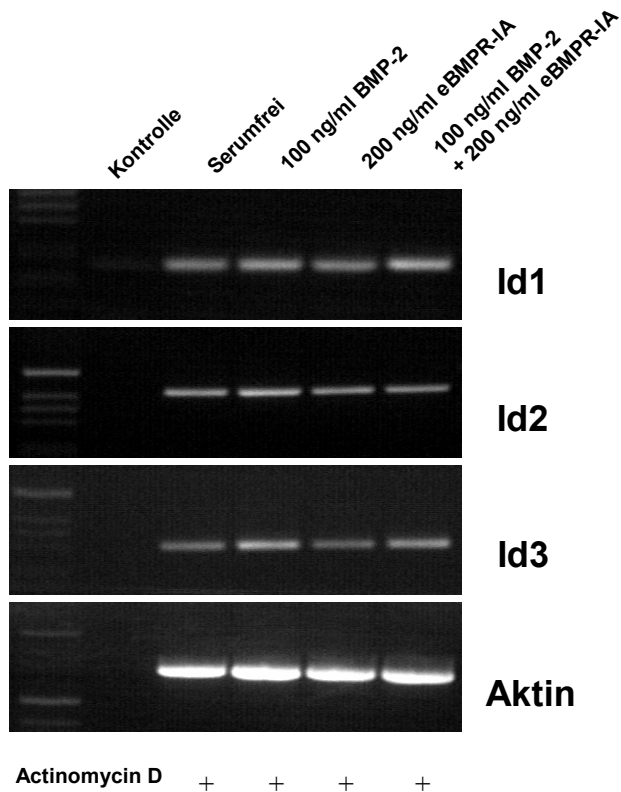
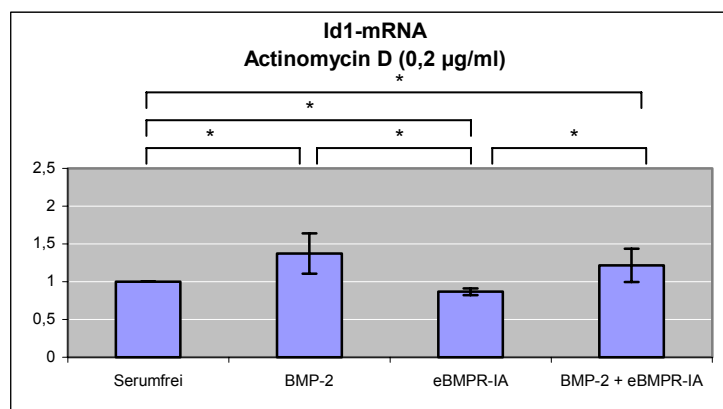


Abb. 3.12: Induktion von MCF-7 mit BMP-2 und eBMPR-IA nach Vorinkubation mit Actinomycin D (0,2 µg/ml) und Nachweis von Id1, Id2 und Id3 und β -Aktin als Kontrolle mittels RT-PCR.

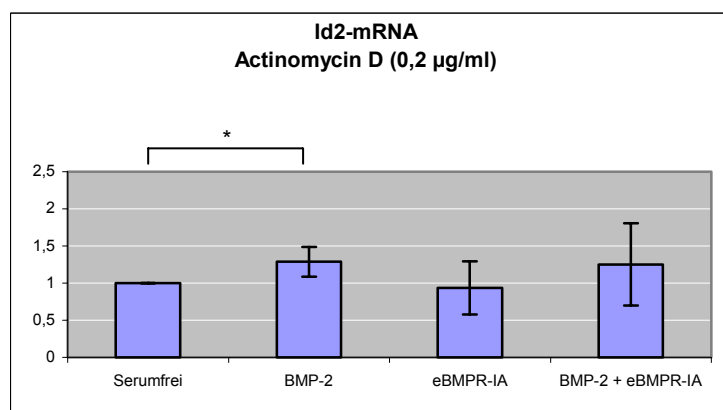
Nach der Vorinkubation mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D vermochte BMP-2 das Id1-mRNA-Level im Mittel um 37 % zu erhöhen. Für die anderen beiden Helix-loop-Helix Proteine lag die Vergrößerung des mRNA-Niveaus bei 29 % und 73%. Die Zugabe der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA erniedrigte den mRNA-Gehalt von Id1 um 13 %. Auf Id2 und Id3 war die Wirkung mit einer Reduktion um 7 % beziehungsweise um 9 % vergleichbar. Beide Faktoren gemeinsam verursachten bei allen drei Proteinen eine Erhöhung der mRNA gegenüber der Kontrollkultur. Diese betrug 22 % bei Id1, 25 % bei Id2 und 81 % bei Id3.

Für alle Veränderungen des mRNA-Gehaltes gegenüber der nicht inkubierten Kontrollkultur (Q_1) wurde mit Hilfe des U-Mann-Whitney-Tests überprüft, ob die Abweichung von 1 signifikant war. Sowohl für Id1 als auch für Id3 erwiesen sich die durch BMP-2 bewirkte Induktion auf mRNA-Ebene, die durch eBMPR-IA bedingte Reduktion des mRNA-Gehaltes ebenso wie der Unterschied zwischen alleiniger Zugabe von eBMPR-IA und Zugabe beider Substanzen gleichzeitig als statistisch signifikant.

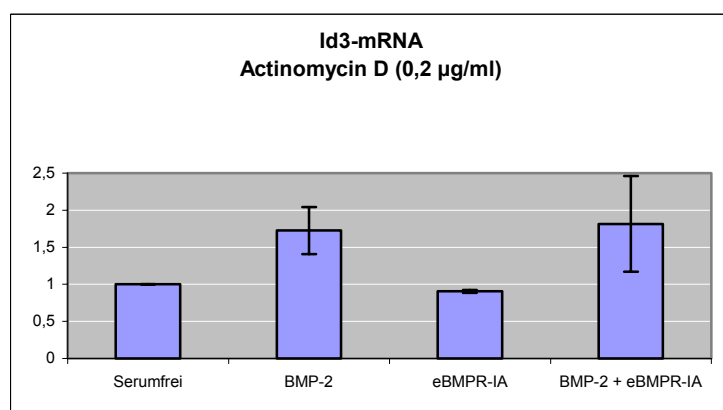
Diese Beobachtungen lassen also die Schlussfolgerung zu, dass eine alleinige Inhibition der Transkription die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine nicht verhindern kann. Posttranskriptionelle Prozesse könnten also bei der BMP-2-abhängigen Regulation der Id-Proteinsynthese eine bedeutsame Rolle spielen.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,37	0,27
eBMPR-IA	0,87	0,04
BMP-2 + eBMPR-IA	1,22	0,22



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,29	0,21
eBMPR-IA	0,93	0,36
BMP-2 + eBMPR-IA	1,25	0,55



Inkubationsbedingung	Id3-mRNA	STABW Id3
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,73	0,32
eBMPR-IA	0,91	0,02
BMP-2 + eBMPR-IA	1,81	0,65

Abb. 3.13: Id-mRNA-Gehalt nach Inkubation von MCF-7 Zellen unter serumfreien Versuchsbedingungen mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA nach Vorinkubation mit Actinomycin D (0,2 µg/ml). *: p = 0,05; n=4

3.3.2 Inkubation mit Cycloheximid

Die MCF-7 Zellen wurden für 6 h zusätzlich zu den Inkubationsstoffen BMP-2 und eBMPR-IA mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid inkubiert. Auf diese Weise ließ sich herausfinden, ob eine Protein-de-novo-Synthese für die Beeinflussung des Id-mRNA-Niveaus eine Rolle spielte. Dazu wurde zu allen Kulturflaschen zum Medium DMEM ohne FCS jeweils 2 µg/ml Cycloheximid gegeben und des Weiteren mit 100 ng/ml BMP-2 beziehungsweise 200 ng/ml eBMPR-IA inkubiert. Eine cycloheximidehaltige Kontrollkultur wurde zum Vergleich angelegt. Überprüft wurden die mRNA-Level der Helix-loop-Helix Proteine Id1, Id2 und Id3 und Aktin.

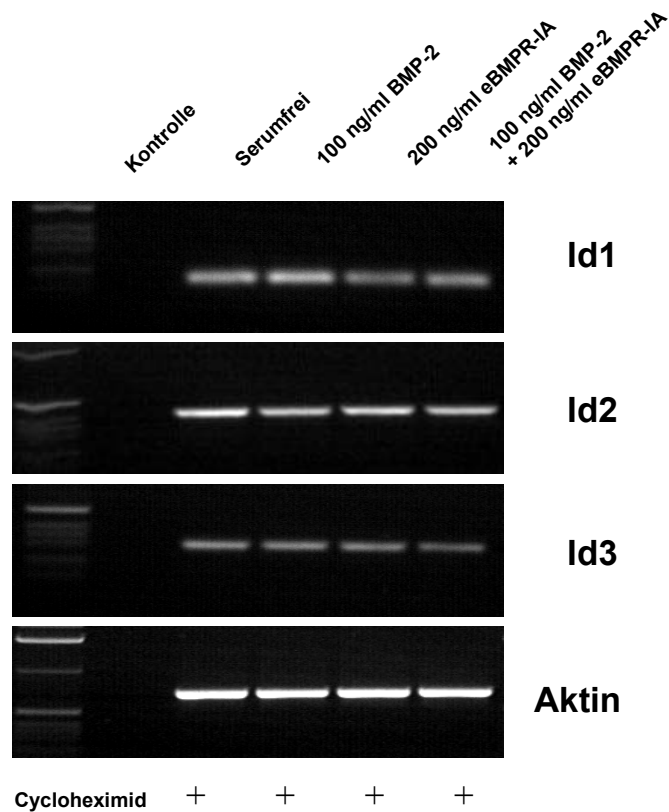


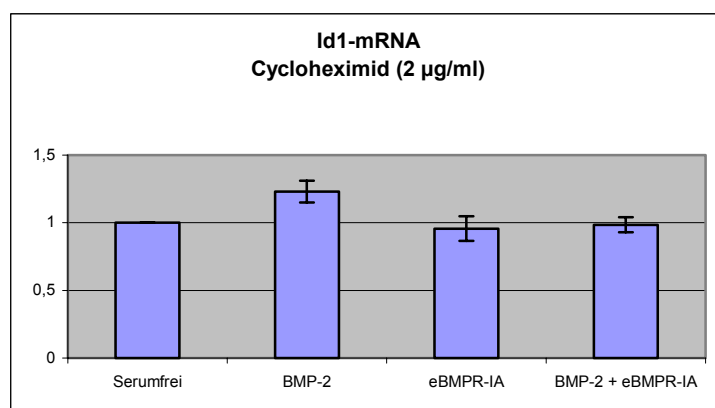
Abb. 3.14: Induktion von MCF-7 mit BMP-2 und eBMPR-IA und Nachweis von Id1, Id2 und Id3 und β -Aktin als Kontrolle mittels RT-PCR.

Um die einzelnen Werte vergleichbar zu machen, wurde β -Aktin für alle Versuchsbedingungen mitbestimmt und zur Auswertung alle Werte auf das jeweilige β -Aktin-mRNA-Niveau gemittelt. Der Versuch wurde unter denselben Bedingungen fünfmal wiederholt. Nach Berechnung von Q (3.1.1) für die unterschiedlichen Versuchsdurchläufe wurde für diese Werte das geometrische Mittel bestimmt und die Standardabweichung berechnet (3.1.2).

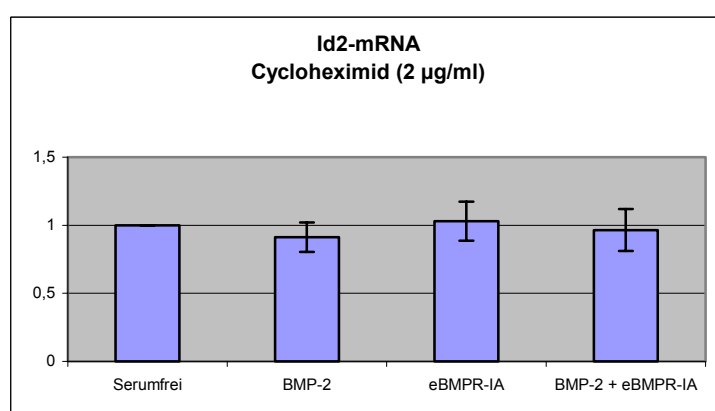
Für den Id1-mRNA-Gehalt ergab sich eine Zunahme gegenüber der Kontrollkultur um 23 %. Die anderen beiden Id-Proteine hingegen konnten nach der Gabe von CHX durch BMP-2 nicht deutlich beeinflusst werden. Bei Id2 kam es zu einer leichten Verringerung des mRNA-Gehaltes um 9 %, während sich das Id3-mRNA-Niveau kaum gegenüber der nicht inkubierten Kontrollkultur veränderte. Nach Inkubation mit 200 ng/ml eBMPR-IA wurde das Id1-mRNA-Level leicht um 4 % gesenkt. Das Id2-mRNA-Level vergrößerte sich um 3 % und das Id3-mRNA-Level wurde ebenfalls um 8 % gesenkt. Ähnlich waren die Auswirkungen beider Inkubationsstoffe gemeinsam. Auch hier zeigten sich für alle drei Id-Proteine nur geringe Effekte. Während das Id1-mRNA-Niveau gegenüber der Kontrollkultur mehr oder weniger gleich blieb, verringerte sich der Id2-mRNA-Gehalt um 4 % und der Id3-mRNA-Gehalt um 6 %. Die genannten Ergebnisse sind in Abb. 3.14 und 3.15 dargestellt.

Für die Veränderung des Mittelwertes von Q gegenüber der Kontrollkultur nach der zusätzlichen Inkubation mit CHX wurde geprüft, ob sich statistische Signifikanzen erwiesen. Keine der bei den Inkubationen erzielten Veränderungen in Bezug auf den mRNA-Gehalt erwiesen sich als statistisch signifikant.

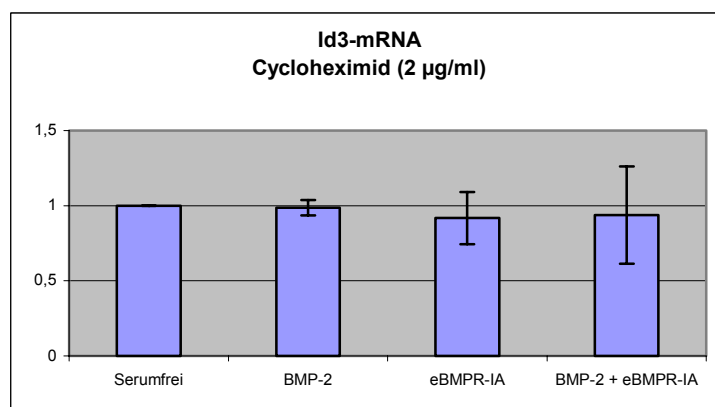
Zusammenfassend konnte man beobachten, dass nach gleichzeitiger Gabe von Cycloheximid es bei allen drei Id-Proteinen zu keiner weiteren Induktion durch BMP-2 kam. Dies bedeutet, dass eine kontinuierliche de-novo-Proteinsynthese wichtig zu sein scheint, um die BMP-2 Wirkung auf die Id-Proteine an den MCF-7 Zellen zu vermitteln.



Inkubationsbedingung	Id1-mRNA	STABW Id1
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	1,23	0,08
eBMPR-IA	0,96	0,09
BMP-2 + eBMPR-IA	0,99	0,05



Inkubationsbedingung	Id2-mRNA	STABW Id2
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	0,91	0,11
eBMPR-IA	1,03	0,14
BMP-2 + eBMPR-IA	0,96	0,15



Inkubationsbedingung	Id3-mRNA	STABW Id3
Serumfrei	1,00	0,00
BMP-2	0,99	0,05
eBMPR-IA	0,92	0,17
BMP-2 + eBMPR-IA	0,94	0,32

Abb. 3.15: Id-mRNA-Gehalt nach Inkubation von MCF-7 Zellen unter serumfreien Versuchsbedingungen mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA bei gleichzeitiger Inkubation mit Cycloheximid (2 µg/ml). n=5

3.4 Western Blot

3.4.1 Nachweis der Id-Proteine in MCF-Zellen nach Inkubation mit BMP-2

Die Wirkung von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde auch auf Proteinebene untersucht. Die MCF-7 Zellen wurden hierzu für 1 h, 2 h, 4 h und 24 h mit 100 ng/ml BMP-2 inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils eine weitere Zellkulturflasche mit MCF-7 ohne Inkubation mitgeführt. Alle Versuche wurden in dem Medium DMEM ohne FCS durchgeführt, nachdem die Zellen zuvor für 24 h „serumfrei“ waren (Kap. 2.2.2). Jeweils 50 µg Protein wurden zum Western Blot eingesetzt und mit einem spezifischen Antikörper gegen das Helix-loop-Helix Protein Id1 auf dessen Vorkommen untersucht. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben zu erreichen, wurde bei allen Membranen nach einer Rehybridisierung zusätzlich der Gehalt des housekeeping-Proteins β-Aktin bestimmt. Die erhaltenen Western Blot Bilder wurden zur Auswertung densitometrisch vermessen und die für das Id1-Protein bestimmten Werte auf den jeweiligen β-Aktin-Gehalt gemittelt. Um den durch BMP-2 erzeugten Effekt zu verdeutlichen, wurde ein Quotient Q_2 wie folgt gebildet:

$$Q_2 = \frac{\text{Id1-Protein in der inkubierten Kultur}}{\text{Id1-Protein in der Kontrollkultur}}$$

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 und 3.17 dargestellt.

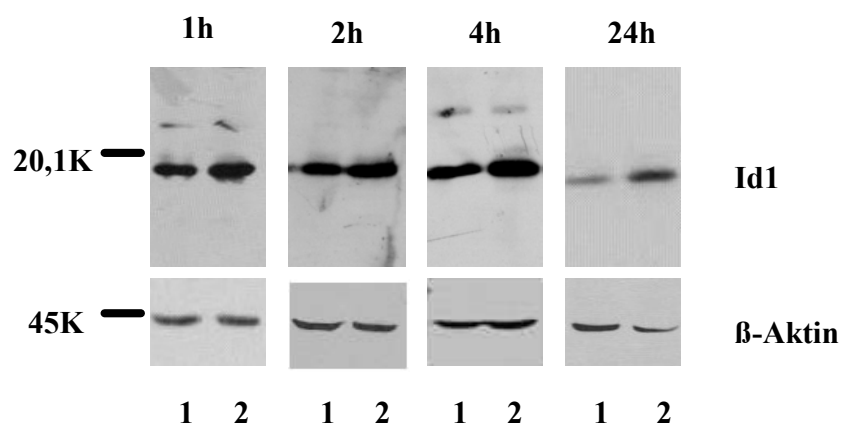


Abb.3.16: Darstellung der Proteine Id1 und β-Aktin mittels Western Blot in MCF-7 Zellen ohne Inkubation (1) und MCF-7 Zellen nach Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 (2) für 1 h, 2 h, 4 h und 24 h.

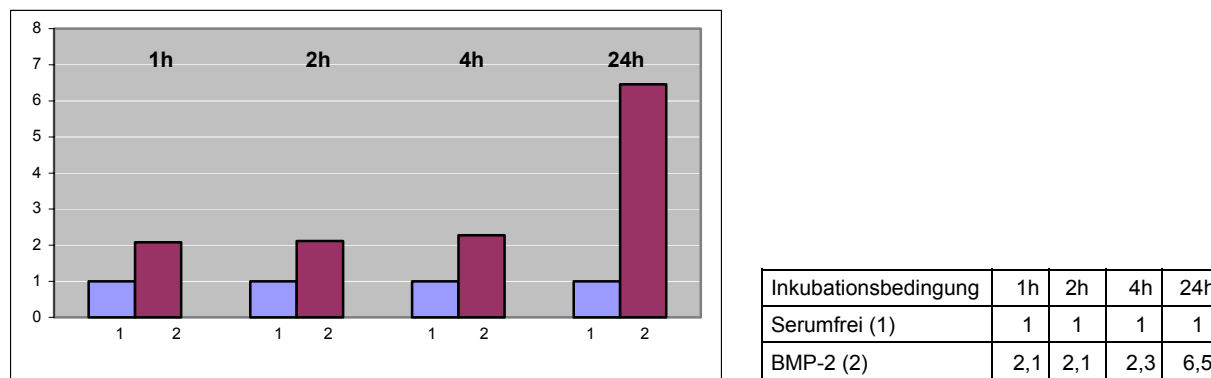


Abb.3.17: Darstellung des Quotienten Q_2 der MCF-7 Zellen nach Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 (2) für 1 h, 2 h, 4 h und 24 h im Vergleich zur serumfreien Kontrollkultur (1). n=2

Für alle vier Inkubationszeiten ergab sich ein deutlicher Anstieg des Proteingehaltes an Id1. Nach einer Inkubationszeit von 1 h lag dieser bei 66 %, nach 2 h bei 70 %, nach 4 h bei 86 % und eine 24-stündige Inkubation bewirkte einen Anstieg um 207 %. Die durch BMP-2 beobachtete Induktion der Id1-mRNA auf mRNA-Ebene wurde so auf Proteinebene bestätigt.

Auch für die Helix-loop-Helix Proteine Id2 und Id3 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit BMP-2 in MCF-7 Zellen eine substantielle Erhöhung des Proteingehaltes bewirkte (Daten nicht dargestellt).

3.4.2 Inkubation mit eBMPR-IA auf Proteinebene

Im Folgenden wurde auf Proteinebene die Wirkung nach Inkubation mit eBMPR-IA untersucht. Die MCF-7 Zellen wurden wie beschrieben ausgesät und über Nacht in DMEM ohne FCS kultiviert (Kap. 2.2.1, 2.2.2). Inkubiert wurde dann jeweils eine Zellkulturflasche mit 100 ng/ml BMP-2, eine weitere mit 200 ng/ml eBMPR-IA, die folgende mit beiden Faktoren parallel, das heißt mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA und eine vierte Flasche wurde als Kontrollkultur mitgeführt. Alle Inkubationen wurden in DMEM ohne FCS für 24 h durchgeführt. Wie in 3.5.1 wurden jeweils die Antikörper gegen Id1 und β -Aktin verwendet und der Quotient Q_2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 und 3.19 dargestellt.

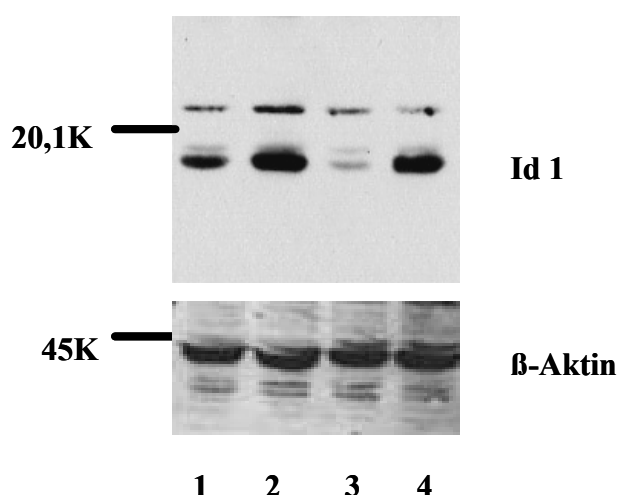
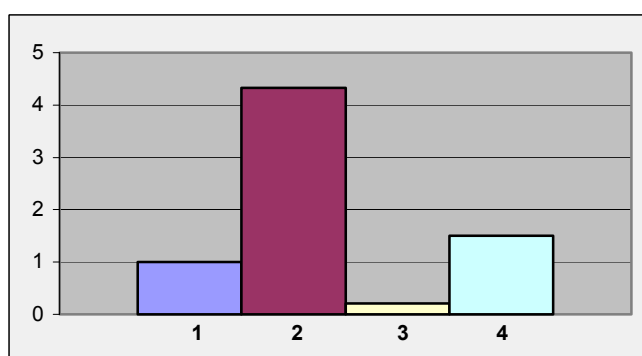


Abb.3.18: Darstellung der Proteine Id1 und β-Aktin mittels Western Blot in MCF-7 Zellen ohne Inkubation (1), nach Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 (2), nach Inkubation mit 200 ng/ml eBMPR-IA (3) und Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA (4).



Inkubationsbedingung	Id1
Serumfrei (1)	1,00
BMP-2 (2)	4,37
eBMPR-IA (3)	0,21
BMP-2 + eBMPR-IA (4)	1,50

Abb.3.19: Darstellung des Quotienten Q_2 in MCF-7 Zellen ohne Inkubation (1), nach Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 (2), nach Inkubation mit 200 ng/ml eBMPR-IA (3) und Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA (4).

Einerseits bestätigte dieser Versuch die in 3.5.1 gewonnenen Ergebnisse, dass eine 24-stündige Inkubation mit BMP-2 zu einer starken Erhöhung des Id1-Proteins führte. Außerdem wurde gezeigt, dass auch eBMPR-IA auf Proteinebene eine deutliche Wirkung hatte. Dabei reduzierte sich der Gehalt an Id1-Protein nach Inkubation mit eBMPR-IA auf 21 %. Diese Ergebnisse stehen damit in Einklang mit den Beobachtungen auf mRNA-Ebene. Bei gleichzeitiger Inkubation mit BMP-2 und eBMPR-IA kam es bei diesem Versuch, der unter serumfreien Bedingungen durchgeführt wurde, zu einer Erhöhung des Gehaltes an Id1-Protein. Auch dies entspricht den Ergebnissen auf mRNA-Ebene (3.2.1)

4. Diskussion

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die Erforschung seiner Ursachen und die Suche nach neuen prädiktiven und prognostischen Faktoren gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung. Knochenmorphogenesefaktoren, die als weit verbreitete Regulatoren von Wachstum, Differenzierung und Apoptose an der Entwicklung zahlreicher Organe beteiligt sind, konnten mittels RT-PCR in Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Arnold et al., 1999; Clement et al., 2000). In letzter Zeit wurden BMPs in diesem Zusammenhang immer mehr mit einer größeren Proliferationsbereitschaft und so mit einem aggressiveren Charakter des Tumors in Verbindung gebracht (Ghosh-Choudhury et al., 2000; Pouliot et al., 2003). Über die genaue Bedeutung und Wirkungsweise des BMP-2 im Mammakarzinom ist jedoch relativ wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 der Einfluss von BMP-2 auf die Expression der Id-Proteine Id1, Id2, Id3 und Sky untersucht und die BMP-2 Wirkung auf unterschiedlichen regulatorischen Niveaus moduliert, um eine genauere Vorstellung über den Wirkungsmechanismus dieses bedeutsamen Wachstumsfaktors zu bekommen. Zunächst wurden MCF-7 Zellen mit rekombinantem BMP-2 in Konzentrationen von 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM mit 10 % FCS für 4 h inkubiert. Mittels RT-PCR wurde dann der mRNA-Gehalt von Id1, Id2, Id3 und Sky bestimmt.

Die RT-PCR stellte dabei ein geeignetes Verfahren dar, den Gehalt an Id-mRNA und Sky-mRNA in den MCF-7 Zellen zuverlässig und schnell zu bestimmen. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen, wurde die PCR innerhalb eines Versuches jeweils mindestens zweimal wiederholt. Außerdem wurden zur Auswertung die Ergebnisse mindestens drei unabhängiger Experimente mit identisch vorbehandelten Zellen miteinander verglichen. Eine Verunreinigung der in die PCR-eingesetzten cDNA mit genomischer DNA konnte nie völlig ausgeschlossen werden. Die für die Genamplifikation benutzten Primer wurden aber so ausgewählt, dass sie stets in unterschiedlichen Exons plaziert waren. So würden die von der genomischen DNA entstehenden Amplifikationsprodukte weitaus größer ausfallen, und man könnte sie leicht von den aus cDNA generierten PCR-Produkten unterscheiden.

Zur weiteren Auswertung wurden die Proben densitometrisch vermessen und anhand der jeweiligen Menge β -Aktin standardisiert. β -Aktin kam als House-keeping-Gen in allen Zellen zu einem vergleichbaren Anteil vor. So ließ die jeweilige Menge an β -Aktin der Probenpaare einen Rückschluss auf die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA zu. Obwohl bei der cDNA-

Synthese durch vorherige photometrische Bestimmung bereits sicher gestellt wurde, dass jeweils nur 1 μg Gesamt-RNA zur Synthese eingesetzt wurde, konnte durch diese Proben-mRNA/ β -Aktin-mRNA Quotientenbildung eine weitere Qualitätsverbesserung der gewonnenen Daten erzielt werden. Unter diesen Bedingungen war eine zuverlässige Auswertung der Experimente möglich. In einem weiteren Schritt wurde nun wie im Ergebnisteil beschrieben ein Quotient Q1 zwischen inkubierter Kultur und Kontrollkultur gebildet. So erhielten wir einen Zahlenwert mit dessen Hilfe eine statistische Analyse möglich wurde. Allerdings musste berücksichtigt werden, dass die Aussagekraft der auf β -Aktin gemittelten Werte leicht gemindert ist, denn Schwankungen innerhalb der β -Aktin-Expression einzelner Zellen oder Beeinflussungen durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen ließen sich nicht völlig ausschließen.

Auch geringe Änderungen des mRNA-Gehaltes können biologisch relevant sein. Deswegen ist es durchaus möglich, dass bei zu hohen Signalintensitäten Veränderungen in der Expression der Id-Proteine oder Sky sogar noch unterschätzt wurden. Um diesem Fehler entgegen zu wirken, der vor allem auftritt, wenn die Taq-Polymerase nicht mehr in ihrem linearen Bereich arbeitet, wurden die densitometrisch bestimmten Flächeninhalte der PCR-Banden anhand einer mit Aktin-Standards hergestellten Eichkurve korrigiert.

In den Inkubationsversuchen kam es nach Zugabe von BMP-2 in allen Fällen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des mRNA-Gehaltes von Id1, Id2, Id3 und Sky im Vergleich zur serumhaltigen Kontrollkultur. Die Inkubationszeit von 4h wurde gewählt, da sich in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass es sich bei der durch BMP-2 bedingten Induktion an MCF-7 Zellen um eine late-response-Reaktion handelte mit einem maximalen Anstieg des mRNA-Gehaltes zwischen 4h und 24h (Clement et al., 2000). Der reine Wechsel des Mediums konnte als mögliche Ursache der Induktion ausgeschlossen werden, denn auch bei der Kontrollkultur wurde stets ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine liganden-unabhängige Aktivierung der Rezeptorkinaseaktivität konnte ebenfalls durch die Negativ-Kontrollen ausgeschlossen werden.

Die durch BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine auf mRNA-Ebene wurde auch von Ogata und Kollegen an einer osteoblastären Zelllinie beobachtet (Ogata et al., 1993). Dabei erhöhte rekombinantes humanes BMP-2 (10 ng/ml) die Id-mRNA Level um das Dreifache, wobei der maximale Effekt nach 24 h auftrat. Eine Erhöhung konnte in Konzentrationen von 1 ng/ml bis hin zu 100 ng/ml erzielt werden. Auch in einer Myeloblastenzelllinie der Maus konnte beobachtet werden, dass der Id1-mRNA-Gehalt durch BMP-2 deutlich erhöht wurde (Katagiri et al., 1994). Nach Auswertung von Northern Blots fanden Katagiri und Kollegen

den Anstieg der Id1-mRNA allerdings schon nach einer Stunde. Ebenfalls eine early-response beobachteten Hollnagel und Kollegen an embryonalen Stammzellen der Maus. Mit Northern Blots untersuchten sie die Expression unterschiedlicher Gene nach Induktion mit 5 ng/ml BMP-2 bzw. BMP-4. Dabei kam es bei allen drei Id-Proteinen zu einem deutlichen Anstieg des mRNA-Niveaus nach einer Stunde (Hollnagel et al., 1999). Dies entspricht einer immediate-early-response, die unabhängig von einer de novo-Proteinsynthese geschieht. Auffällig ist das unterschiedliche Antwortverhalten der verschiedenen Zelllinien auf den externen BMP-2 Stimulus. Dabei reagieren die MCF-7 Zellen deutlich später mit einer Erhöhung der mRNA der Id-Proteine als beispielsweise die embryonalen Mausstammzellen. Mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass es sich bei der Mausstammzelllinie CCE um omnipotente noch undifferenzierte Zellen handelt, die im Gegensatz zu den relativ ausdifferenzierten MCF-7 Zellen deutlich intensiver und schneller nach Inkubation mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 mit einer Induktion der embryonal bedeutsamen Gene Id1, Id2 und Id3 reagieren. Außerdem legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass in Bezug auf eine äußere Stimulation mit BMPs Unterschiede im Signalmechanismus zwischen den einzelnen Zelllinien existieren könnten, was erklären würde, warum myoblastische Zellen anders als Mammakarzinomzellen auf den Wachstumsfaktor reagieren. Um eine genauere Vorstellung der Signalübermittlung bei den Mammakarzinomzellen zu gewinnen, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Parallel zu der Inkubation mit BMP-2 wurde versucht, die BMP-2 Wirkung auf Rezeptorebene mit Hilfe der rekombinant hergestellten Form der extrazellulären Domäne des BMP-TypI-Rezeptors (eBMPR-IA) zu modulieren, wobei diese einerseits alleine und in einem weiteren Ansatz gemeinsam mit BMP-2 zugegeben wurde. Die Vorstellung dabei war, dass die lösliche Form des eBMPR-IA mit den endogenen BMP-Rezeptoren um die BMP-2 Bindungen kompetiert und deswegen deutlich weniger BMP-2 als Ligand für die zelluläre Signalübertragung zur Verfügung stände. Zur gleichzeitigen Inkubation wurde eBMPR-IA jeweils in der doppelten Menge des BMP-2 verwendet. Diese 2:1 Stöchiometrie wurde von Kirsch und Kollegen (2000a) zuerst beschrieben. Mit Hilfe eines E.coli-Expressionssystems stellten sie eine lösliche Form der extrazellulären Domäne des Typ-I-Rezeptors her. Durch Titration von BMP-2 und eBMPR-IA entdeckten sie einen trimeren BMP-2*sBMPR-IA Komplex, der sich durch Gelfiltration und Gelelektrophorese bestätigen ließ (Kirsch et al. 2000a).

Die Auswertung der Versuche mittels RT-PCR der Id-Proteine hat ergeben, dass bei allen drei Id-Proteinen die durch BMP-2 bedingte Induktion in Konzentrationen von 25 ng/ml bis 100

ng/ml BMP-2 durch die jeweils angemessene Menge an löslichem eBMPR-IA erfolgreich inhibiert werden konnte. Diese Ergebnisse waren sehr eindrucksvoll, so kam es beispielsweise nach gleichzeitiger Zugabe von BMP-2 und eBMPR-IA zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Id1-mRNA. Alle Ergebnisse erwiesen sich mit Hilfe des exakten U-Mann-Whitney Tests als statistisch hoch signifikant und im Fall von Id3 sogar als höchst signifikant. Diese Resultate sind vergleichbar mit anderen in der Literatur beschriebenen Daten. Zimmermann et al. (1996) überprüften beispielsweise den Einfluss des extrazellulären Inhibitor Noggin auf BMP-4 an der murinen Knochenmarkstromalzelllinie W-20-17. Hierbei handelt es sich um einen direkten, quantitativen Bioassay zur Beurteilung der BMP-2 Aktivität mittels Induktion der Alkalischen Phosphatase (Thies et al., 1992). Es zeigte sich, dass Noggin in äquimolarer Dosierung die BMP-4 Wirkung fast vollständig inhibieren konnte (Zimmermann et al., 1996). Noggin bindet das BMP-4 Protein direkt und verhindert so die weitere Interaktion mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für die Signalübertragung entscheidende Bedeutung hatte. Auch für das extrazelluläre Protein Chordin, welches mit 120 kDa deutlich größer als die zuvor genannten Proteine ist, wurden ähnliche inhibitorische Eigenschaften beschrieben. Obwohl dieses keine Strukturähnlichkeiten zu Noggin besitzt, bindet es BMP-2 extrazellulär und hemmt so jegliche weitere Rezeptorinteraktionen (Massagué und Chen, 2000). Es scheint so, als ob in Bezug auf die Regulierung der BMP-2 Signalübertragung die Ligandenverfügbarkeit zunehmend eine Schlüsselrolle einnimmt. So muss in diesem Zusammenhang auch die Dan-Gruppe von Inhibitoren genannt werden, die ebenfalls extrazellulär potente BMP-antagonistische Eigenschaften vor der Rezeptorebene haben (Hsu et al., 1998; Stanley et al., 1998; Pearce et al., 1999; Piccolo et al., 1999; Shi et al., 2001). Beispielsweise wurde ebenfalls an der Zelllinie W-20-17 anhand der AP-Induktion die Wirkung des 25 kDa großen sekretorischen Proteins Gremlin, ein Mitglied der Dan-Familie, auf exogen hinzugefügtes BMP-2 getestet. Gremlin vermag in einer Konzentration von 82 nM die Wirkung von 78 pM bis hin zu 5 nM BMP-2 vollständig zu blockieren, bei 21 nM Gremlin kommt es allerdings nur zu einer partiellen Inhibition (Hsu et al., 1998).

Trotz der synergistischen Wirkung in Hinblick auf eine effektive Inhibition der BMP-2 Rezeptorinduktion, besteht ein bedeutsamer Unterschied zwischen oben aufgeführten Inhibitoren und dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten eBMPR-IA. BMP-2 besitzt mit einer K_d von ungefähr 10^{-9} bis 10^{-10} eine sehr hohe Affinität zu seinen Rezeptoren (Koenig et al., 1994; Iwasaki et al., 1995). Des Weiteren ist in erster Linie die Typ-I-Kette für die Bindung des BMP-2 Homodimers an den membranständigen Rezeptor verantwortlich (Kirsch et al., 2000b). Diese beiden Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass mit der löslichen Form der

extrazellulären Domäne des BMPR-IA Rezeptors in Bezug auf Affinität und Bindungsintensität ein sehr effektiver Antagonist vorliegt. Noggin hingegen muss beispielsweise mit einer K_d von 19 pM, was für einen externen Inhibitor immer noch eine sehr hohe Affinität darstellt, für eine erfolgreiche Inhibition immer im 100fachen Überschuss zugegeben werden und ähnliches gilt für Gremlin (Zimmermann et al., 1996; Hsu et al., 1998). Für die Dan-Familie der Antagonisten wurde ein etwa 90 Aminosäuren umfassender, Zysteinreicher Bereich beschrieben, der bei allen Mitglieder gefunden werden konnte und für die Bindung des Antagonisten an das BMP-2 postuliert wird (Hsu et al., 1998). Diese Region ist dem Zystinknoten des BMP-2 verwandt, worüber eine 3-dimensionale Struktur geformt werden kann, die durch 3 Disulfidbrücken stabilisiert wird (McDonald und Hendrickson, 1993). Deshalb ist es leicht zu verstehen, dass die Bindung nicht so fest und die Affinität nicht so hoch sein kann, wie bei einer löslichen Form der extrazellulären Domäne eines spezifischen Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits mit einer Zugabe von der jeweils doppelten Menge an eBMPR-IA eine deutliche Hemmung der durch BMP-2 verursachten Induktion der Id1-, Id2- und Id3-mRNA erzielt werden. Auch wenn dies nicht statistisch signifikant belegt werden konnte, war die Inhibition bei Inkubation mit 50 ng/ml BMP-2 und 100 ng/ml eBMPR-IA und 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA scheinbar effektiver als bei Zugabe von 25 ng/ml BMP-2 und 50 ng/ml des Inhibitors. Dies kann gut in Einklang gebracht werden mit der Tatsache, dass bei MCF-7 Zellen für das BMP-2 Protein in Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml ein Wirkungsmaximum beschrieben werden konnte (Clement et al., 2000).

Auch bei alleiniger Inkubation mit eBMPR-IA kam es zu einer Erniedrigung des Id-mRNA-Gehaltes im Vergleich zur serumhaltigen Kontrollkultur. Diese war nicht so groß wie bei gleichzeitiger Gabe von BMP-2 und eBMPR-IA, jedoch waren die Ergebnisse für die Proteine Id1, Id2 und Id3 jeweils wiederholbar und statistisch zu belegen. Die extrazelluläre Domäne des Typ-I-Rezeptors scheint also auch entweder im Serum vorhandene Aktivität oder von den MCF-7 Zellen selbst produzierte Proteine zu inhibieren. Außerdem binden auch andere TGF- β s an den BMPR-IA und so wird möglicherweise auch deren Aktivität inhibiert. Die gleiche Beobachtung wurde auch von Zimmermann und Kollegen mit dem extrazellulären Inhibitor Noggin gemacht, wobei Noggin bei alleiniger Gabe zwar nur einen kleinen aber dennoch reproduzierbaren inhibitorischen Effekt auf die AP-Aktivität der W-20-17-Zellen hatte (Zimmermann et al., 1996).

Die Zugabe von eBMPR-IA wurde in weiteren Versuchen zeitlich versetzt durchgeführt, um eine Vorstellung über die Kinetik der Interaktion von BMP-2 mit seinem Rezeptor zu bekommen. Überraschenderweise erzielte eine nachträgliche Zugabe des eBMPR-IA bereits

nach 5 min so gut wie keinen Hemmeffekt mehr. Das gleiche konnte ebenfalls bei einer Zugabe von eBMPR-IA 10 min und 30 min nach BMP-2 beobachtet werden. Das Ausmaß der Id-Induktion, vor allem für Id1 und Id2, lag zwar stets geringfügig unter der durch BMP-2 allein bedingten Erhöhung der Id-mRNA, aber von einer Inhibition lässt sich deswegen nicht ausgehen. Dieser Unterschied im Gehalt an Id-mRNA kann auch zufällig bedingt sein, wobei die Erhöhung der Id-mRNA auch in vorherigen Experimenten jeweils variierte. Diese Versuche lassen also die Schlussfolgerung zu, dass die BMP-2-abhängige Signalkaskade schon sehr früh, das heißt innerhalb der ersten 5 Minuten, aktiviert wird und somit die Ids direkte Zielgene sind. Die spätere Zugabe eines extrazellulären Inhibitors bleibt deswegen ohne weiteren Effekt. In Ergänzung dazu wurde parallel eine Versuchsreihe mit einer Vorweginkubation mit eBMPR-IA durchgeführt und dann BMP-2 jeweils nach 5 min, 10 min und 30 min dazugegeben. In allen Fällen kam es in diesen Versuchen zu keiner Induktion der Id-mRNA durch BMP-2. Diese Ergebnisse stehen damit in Einklang mit den Beobachtungen, die von anderen Arbeitsgruppen mit extrazellulären Inhibitoren gemacht wurden. Dabei wurde mit Noggin oder Chordin in den meisten Fällen vorinkubiert, um einen vollen inhibitorischen Effekt zu erzielen (Hsu et al., 1998; Zimmermann et al., 2000). Es bleibt zu betonen, dass eBMPR-IA sogar bei gleichzeitiger Gabe den BMP-2 Effekt inhibieren konnte.

Auch die Rezeptortyrosinkinase Sky wurde in Hinblick auf eine Inkubation mit BMP-2 unterschiedlicher Konzentrationen und den Einfluss der extrazellulären Domäne des Typ-I-Rezeptors an den Mammakarzinomzellen MCF-7 untersucht. Rezeptortyrosinkinasen spielen eine essentielle Rolle bei Wachstum und Differenzierung (Schlessinger, 1992). Auch in der weiblichen Brust wurde Sky gefunden (Mark et al., 1994). Eine Überexpression von Sky wurde von Taylor und Kollegen bereits in Mammakarzinomen von transgenen Mäusen beschrieben (Taylor et al., 1995).

Ebenso wie die Proteine Id1, Id2 und Id3 wurde die Rezeptortyrosinkinase Sky durch BMP-2 deutlich hochreguliert. Auch diese Ergebnisse lassen also die Vermutung zu, dass eine BMP-2 bedingte Überexpression von Sky zum malignen Potential und einer Progression des Mammakarzinoms beitragen könnte. Die genaue Rolle der Rezeptortyrosinkinasen in der Tumorigenese und ihre Expression in unterschiedlichen Mammakarzinomen ist allerdings noch nicht gut erforscht. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant, mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden verschiedene Mammakarzinomgewebe auf ihren Gehalt an Sky und dessen Vorkommen in unterschiedlichen Bereichen des Tumors zu prüfen. Wir fanden auf mRNA-Ebene, dass die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 Sky-mRNA exprimiert und dessen Gehalt durch BMP-2 deutlich induziert werden konnte. Diese BMP-2 bedingte Induktion ge-

nauso wie bei den Id-Proteinen durch eBMPR-IA erfolgreich antagonisiert werden, das heißt, es handelte sich hierbei keineswegs um ein Phänomen, was nur bei den Id-Proteinen zu beobachten war. Auch alleinige Inkubation mit eBMPR-IA bewirkte eine Inhibition der Sky-Gen-expression, was wiederum für eine Hemmung von endogen von den MCF-7 Zellen produziertem BMP-2 oder einer Inhibition von BMP-2 Aktivität im Serum spricht.

Die Inkubationsversuche wurden auch unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die MCF-7 Zellen über Nacht in DMEM ohne FCS kultiviert und so in eine Art Hungerzustand versetzt. Es ist bekannt, dass Zellen unter serumfreien Bedingungen eine andere Rezeptorausstattung besitzen können und so verstärkt oder völlig anders reagieren. So wurde beispielsweise von López-Rovira und Kollegen (2002) beschrieben, dass die BMP-2 bedingte Induktion von Id1 bei Zellen, die über Nacht unter serumfreien Bedingungen kultiviert worden waren, deutlicher zu beobachten war (López-Rovira et al., 2002). Ähnliches wurde auch für den inhibierenden Effekt von BMP-2 auf HOB- und HBMSC-Zellen unter serumfreien Bedingungen beschrieben, der so klarer zu Vorschein kam (Lecanda et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte bei genauem Vergleich zwischen serumfreien und serumhaltigen Bedingungen nur für das Id2-Protein ein signifikanter Unterschied für die eBMPR-IA bedingte Hemmung beobachtet werden, die unter serumhaltigen Bedingungen weniger stark ausfiel. Aber auch für die durch BMP-2 bedingte Induktion der Proteine, insbesondere für Id2 und Sky, fiel auf, dass der Effekt unter serumfreien Bedingungen deutlicher erschien. Allerdings war dieser Unterschied nicht so ausgeprägt, dass er sich statistisch belegen ließe. Grund für diese Beobachtung könnte einerseits eine veränderte Rezeptorausstattung sein, in der Annahme, dass die Zellen im Hungerzustand zusätzliche Rezeptoren zur Signaltransduktion auf der Zellmembran präsentieren, damit jeder externe Stimulus zu einer erfolgreichen Signalübertragung führte. Es wurde aber auch beschrieben, dass beispielsweise Id1 durch Serum alleine schon hochreguliert wird, was ebenso den deutlicheren Effekt unter serumfreien Bedingungen erklären könnte (Tournay und Benezra, 1996).

Sehr auffällig war allerdings der induktive Effekt von der kombinierten Inkubation mit BMP-2 und eBMPR-IA unter serumfreien Bedingungen. Der Unterschied im mRNA-Niveau erwies sich für Id1, Id2 und Id3 als hoch signifikant im Vergleich zu gleichen Inkubationsbedingungen unter serumhaltigen Bedingungen. Eigentlich wurde unter serumfreien Bedingungen ebenso wie bei den parallelen serumhaltigen Versuchen eine deutliche Hemmung auf mRNA-Ebene erwartet. Jedoch kam es bei allen Inkubationen in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen und zu unterschiedlichen Zeiten reproduzierbar zu einer Induktion. Über den Wirkungsmechanismus, der zu dieser deutlichen Induktion führte, kann nur spekuliert werden.

Einerseits ist es möglich, dass der extrazelluläre Inhibitor zwar an die BMP-2 Proteine bindet, es jedoch, wahrscheinlich aufgrund der großen Bereitschaft der Zellen, Signale zu übertragen, zu keiner Inhibition der Signalübertragung kommt, sondern der ganze BMP-2–eBMPR-IA–Komplex als Induktor funktioniert. Vielleicht kommt es unter serumfreien Bedingungen auch zu einer Verschiebung der Ligandenspezifität in Bezug auf dessen Bindung von BMP-2. Außerdem wäre es gut vorstellbar, dass sich in dieser Art Hungerzustand die Zusammensetzung der akzessorischen Proteine, die den BMPs helfen, an den Rezeptor zu binden, wie beispielsweise das Heparin, verändert und es so mit deren Hilfe zu einer erhöhten Rezeptoraktivierung käme. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass es unter serumfreien Bedingungen zu einer verstärkten endogenen BMP-2 Produktion kommt und so die Menge des eBMPR-IA nicht ausreicht, um die BMP-2 Wirkung zu inhibieren.

Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Id-Proteinen in Bezug auf die Wirkung von BMP-2 oder eBMPR-IA konnten in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Dies mag vor allem daran liegen, dass ein Großteil der Versuche mit derselben Inkubationszeit von 4 h durchgeführt wurde. Bereits andere Arbeiten zeigten, dass Id1, Id2 und Id3 sich vor allem in Bezug auf ihre zeitliche Reaktion nach Inkubation mit BMP-2 unterscheiden (Clement et al., 2000; Korchynskyi und ten Dijke, 2002).

Um heraus zu finden, auf welchem Niveau BMP-2 die Induktion der Id-Gene bewirkte, wurde mit Actinomycin D in einer in der Literatur bekannten Konzentration von 0,2 µg/ml inkubiert (Ogata et al., 1993). Trotz Vorinkubation mit Actinomycin D bewirkte BMP-2 eine Induktion der Id-mRNA, die sich für Id1 und Id3 auch als statistisch signifikant erwies. eBMPR-IA hatte keinen hemmenden Effekt und bei gleichzeitiger Inkubation mit BMP-2 und dem Inhibitor war die BMP-2 Wirkung nicht unterdrückt, was den Versuchen unter serumfreien Bedingungen entsprach. In der Literatur wird diskutiert, ob durch BMP-2 bedingte Induktionen auf Transkriptionsebene stattfinden oder doch in erster Linie auf posttranskriptionelle Prozesse zurückzuführen sind.

So beschreibt Ogata und Kollegen, dass BMP-2 in der osteoblastären Zelllinie MC3T3E1 trotz Vorinkubation mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D das mRNA- Niveau der Id-Proteine erhöhte (Ogata et al., 1993). Dabei führte Actinomycin D zu einer zweifachen Steigerung der Id-mRNA und die zusätzliche Gabe von 100 ng/ml BMP-2 bewirkte eine weitere Erhöhung um noch einmal das Zweifache. Während man sich die durch alleinige Gabe von Actinomycin D erzielte Beeinflussung der Id-mRNA durch die Hemmung der Transkription von Suppressoren erklärte, deuteten Ogata und Kollegen die Tatsache, dass

trotz Anwesenheit von Actinomycin D der BMP-2 Effekt deutlich zu erkennen war, als Hinweis dafür, dass bei der Regulierung der Id-Gen-Expression durch BMP-2 posttranskriptionelle Prozesse eine große Rolle spielen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Hollnagel. Sie beobachteten an embryonalen Stammzellen, dass nach einer Vorinkubation mit Actinomycin D (5 µg/ml) die Induktion von Id1, Id2 und Id3 völlig blockiert wurde und schlussfolgerten somit eine Regulierung der Id-Gene auf Transkriptionsebene.

Auch Korchynskyi und ten Dijke stellten in diesem Zusammenhang an der Myoblastenzelllinie C2C12 der Maus fest, dass die Zugabe von Actinomycin D den BMP-2 induzierenden Effekt auf die Id1-Expression inhibierte. Sie halten die Hochregulierung des Id1 Proteins deswegen für transkriptionsabhängig (Korchynskyi und ten Dijke, 2002). Genau das gleiche beobachteten, ebenfalls an C2C12-Zellen, López-Rovira und Kollegen (López-Rovira et al., 2002).

Dahingegen wurde jedoch von anderen Autoren im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben, dass BMP-2 oder andere BMPs die Genexpression posttranskriptional beeinflussen. Yeh et al. untersuchten kultivierte Osteoblastenzellen der Ratte in Hinblick auf die Regulierung der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1)-Expression durch BMP-7 und stellten keinerlei Beeinflussung durch den Transkriptionsinhibitor Actinomycin D heraus (Yeh et al., 2001). Ebenso wurde für die Osterix-Genexpression in primären Kulturen von Chondrozyten gezeigt, dass die Regulierung durch BMP-2 posttranskriptional geschieht (Yagi et al., 2003).

Eine Regulierung von Id1, Id2 und Id3 auf posttranskriptionaler Ebene wäre nichts Ungewöhnliches. Auch für andere tumorbiologische Faktoren wurde bereits gezeigt, dass sie durch Mitglieder der TGF-β-Superfamilie auf diese Weise induziert werden. Die Matrixmetalloproteinase MMP-9 beispielsweise wird durch TGF-β1 posttranskriptional hoch reguliert (Sehgal et al., 1999). Für den Transkriptionsfaktor AIB1 wurde an MCF-7 Zellen ebenfalls beobachtet, dass seine Regulierung auf posttranskriptioneller Ebene geschieht und dass diese Induktion zumindest teilweise auf TGF-β zurückzuführen ist (Lauritsen et al., 2002). Ebenso wurde an kolorektalen Tumoren gezeigt, dass der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p27Kip1 hauptsächlich posttranskriptionell reguliert wird (Ciaparrone et al., 1998).

Andererseits fällt bei sehr genauem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwischen der Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und 200 ng/ml eBMPR-IA unter serumfreien Bedingungen und demselben Versuch unter Vorinkubation mit Actinomycin D auf, dass das

Ausmaß der BMP-2 Induktion bei den mit Actinomycin D vorinkubierten Zellen sich als kleiner darstellt als bei alleiniger Inkubation mit BMP-2, wobei dies nur für Id1 und Id2 zu beobachten war. Dies unterstützt die Vermutung, dass vielleicht Unterschiede in der Signalübertragung der einzelnen Id-Proteine bestehen. Für die Proteine Id1 und Id2 lässt es sich nicht völlig ausschließen, dass auch eine Regulierung auf Transkriptionsebene teilweise für den BMP-2 induzierten Einfluss der Genexpression verantwortlich ist. Regulierungen sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene durch Mitglieder der TGF- β -Familie wurden schon vielfältig in der Literatur beschrieben (Yeh et al., 1998; Moriguchi et al., 1999; Gong et al., 2003).

Möglichkeiten der posttranskriptionalen Regulierung umfassen Veränderungen in Bezug auf die mRNA-Stabilität, Modifizierungen der Translationsrate eines Proteins, seiner Halbwertszeit oder seiner Sekretion. In diesem Fall handelt es sich am ehesten um eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität. Dabei gibt es zwei mögliche Mechanismen, die eine Erhöhung der Stabilität der mRNA erklären würden. Einerseits könnten RNA-stabilisierende Proteine hochreguliert werden oder aber RNA-destabilisierende Faktoren werden herunterreguliert. Eine elegante Methode, um zwischen diesen beiden Wegen zu unterscheiden, ist die Inkubation mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid.

Die Inkubationsversuche mit Cycloheximid (CHX) zeigten, dass die durch BMP-2 bedingte Induktion der Id-mRNA unter Anwesenheit von CHX völlig ausblieb. Dabei wurde Cycloheximid mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ so gewählt, dass es die Proteinneusynthese effektiv hemmen konnte (Ogata et al., 1993). Des weiteren war der inhibitorische Effekt von Cycloheximid nicht auf eine toxische Ursache zurück zu führen, da selbst nach einer Stimulation über 6h die subjektiv unter dem Mikroskop eingeschätzte Zellviabilität vergleichbar war mit der unbehandelten Zellen. Für alle drei Id-Proteine Id1, Id2 und Id3 konnte beobachtet werden, dass nach gleichzeitiger Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2 und Cycloheximid die mRNA-Niveaus nach 6-stündiger Inkubation in etwa dem mRNA-Niveau der serumfreien Kontrollkultur entsprachen. Keine der Abweichungen erwies sich mit Hilfe des U-Mann-Whitney-Tests als statistisch signifikant. Der durch eBMPIA erzielte Hemmeffekt war ebenfalls nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen also die Schlussfolgerung zu, dass die durch BMP-2 bedingte Induktion der Id1-, Id2- und Id3-Genexpression von einer de-novo-Protein-synthese abhängig ist. Zur selben Annahme kamen auch Ogata und Kollegen. Diese untersuchten an der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MC3T3E1 den Effekt von CHX in gleicher

Konzentration auf die BMP-2 bedingte Id-Induktion und beobachteten diesbezüglich, dass CHX die durch BMP-2 verursachte Erhöhung der mRNA der Id-Proteine vollständig blockierte (Ogata et al., 1993). Auch für C2C12-Zellen, eine Myeloblastenzelllinie der Maus, wurde in diesem Zusammenhang fest gestellt, dass die Inkubation mit CHX zwar zu einer Erhöhung des basalen Levels der Id1-mRNA führte, es danach aber zu keiner weiteren Stimulation durch BMP-2 kam (Katagiri et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen, die an derselben Myeloblastenzelllinie der Maus gemacht wurden, wobei trotz Anwesenheit von CHX die durch BMP bedingte Induktion der Id1-Genexpression vorhanden war oder die Gabe von CHX diese sogar erhöhte ((Korchynskyi und ten Dijke, 2002; López-Rovira et al., 2002). Auch Hollnagel und Kollegen beschrieben an embryonalen Stammzellen, wie CHX die Induktion des mRNA Levels der Id-Proteine eher verstärkte (Hollnagel et al., 1999). Diese Arbeitsgruppen kamen also zu dem Schluss, dass eine de-novo-Proteinsynthese für die Signalübertragung des BMP-2 nicht von Bedeutung sei und die Regulierung der Id1-Induktion jeweils auf Transkriptionsebene stattfindet. Die Beteiligung der Proteinneusynthese bei einer BMP bedingten Induktion der Id-Proteine ist also sehr umstritten. Es gibt viele Belege dafür, dass BMP-2 eine Induktion der Genexpression von IGF-I, IGF-II, Activin β A oder dem Osterix Gen nur in Abhängigkeit einer de-novo-Proteinsynthese bewirken kann (Canalis und Gabbitas, 1994; Kearns und Denay, 2000; Yagi et al., 2003). Ferner wurde auch beschrieben, dass selbst bei einer Regulierung auf Transkriptionsebene oft sehr kurzlebige, neu-synthetisierte Transkriptionsfaktoren benötigt werden. So zeigten beispielsweise in einem erst vor kurzem veröffentlichten Artikel Lee und Kollegen, dass für die BMP-2 bedingte Runx2 Expression in C2C12-Zellen eine de-novo-Proteinsynthese benötigt wurde und zwar von dem Transkriptionsfaktor Dlx5 (Lee et al., 2003). Allerdings sind solche Transkriptionsfaktoren, die in Zusammenhang mit Smad1 und Smad4 die Genexpression von Id1 in Antwort auf einen BMP-2 Stimulus erhöhen, gegenwärtig noch nicht beschrieben (Katagiri et al., 2002).

Die unterschiedlichen und zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen lassen sich nur so erklären, dass es bei den BMPs, als multifunktionelle Regulatoren von Wachstum und Differenzierung, ebenso wie für die TGF- β s mehrere unterschiedliche Signalübertragungswege gibt, die zum Teil auch zellspezifisch sind. Wie früher bereits erwähnt, scheint es nicht verwunderlich, dass embryonale Stammzellen oder osteoblastäre Zellen dabei anders reagieren als so ausdifferenzierte Zellen wie die der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten stark darauf hin, dass in den MCF-7-Zellen BMP-2 eine Erhöhung der Id-Proteine Id1, Id2 und Id3 vor allem über posttranskriptionelle

Prozesse bewirkt, wobei es sich dabei um eine Beeinflussung der Stabilität der mRNA handelt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die weitere Signalübertragung auf eine Neusynthese von Proteinen angewiesen war. Die Tatsache, dass unter Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid die Induktion der Id-mRNA vollständig unterdrückt werden konnte, wies eher auf mRNA stabilisierende Proteine hin, deren Synthese durch die Blockierung der de-novo-Proteinsynthese verhindert wurde, als auf eine BMP bedingte Herunterregulierung von destabilisierenden Proteinen. Auch für ein TGF- β abhängiges extrazelluläres Matrixprotein, Elastin, wurde vor kurzem eine ähnliche Signalregulierung beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass die Induktion der Elastin-mRNA einerseits von den Smad-Proteinen Smad-3 und Smad-4 als auch von einer de-novo-Proteinsynthese abhängig ist. Da auch für die Elastin-mRNA bereits bekannt ist, dass sie nicht auf Transkriptionsebene sondern posttranskriptionell reguliert wird, schlussfolgerten die Autoren eine Smad-abhängige de-novo-Proteinsynthese von stabilisierenden Faktoren (Kucich et al., 2002). Eine Signalübertragung mit Hilfe von Smad-Proteinen, in diesem Fall Smad-1 und Smad-4, wurde auch für BMP-2 bereits vielfach beschrieben (Katagiri et al., 2002). Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass es sich bei den MCF-7 Zellen um einen ähnlichen Mechanismus handelt, so dass Smad-abhängig mRNA-stabilisierende Proteine produziert werden. Dies sollte auf jeden Fall Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Tatsache, dass es sich bei den BMPs um so vielfältige Regulatoren von Wachstum, Differenzierung und Apoptose handelt, unterstützt diese Vermutung einer sehr komplexen Signalübertragung, in der es vielfältige Möglichkeiten der Regulierung gibt.

Die Ergebnisse des Inkubationsversuches mit Actinomycin D lassen allerdings den Schluss zu, dass es vielleicht auch Unterschiede in der Signalübertragung zwischen den einzelnen Id-Proteinen gibt. Die BMP-2 bedingte Genexpression von Id1 und Id2 schien auf mRNA-Ebene durch Actinomycin D zu mindestens teilweise inhibiert zu werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Id-Proteinen wurden in Bezug auf die Induktionszeit bereits beschrieben, die Signalübertragung der drei Proteine im Vergleich wurde allerdings noch nicht genauer untersucht (Clement et al., 2000; Korchynskyi und ten Dijke, 2002). In der Annahme, dass es sich bei Id1 am ehesten um ein immediate-early-response-Gen handelte, wurde von den meisten Arbeitsgruppen nur dieses eine Protein weitergehend untersucht (Katagiri et al., 2000; Korchynskyi und ten Dijke, 2002; López-Rovira et al., 2002). Es ist durchaus vorstellbar, dass in den MCF-7 Zellen auch Id1 und Id2 zu einem gewissen Teil transkriptional reguliert werden, wobei jedoch auf jeden Fall eine de-novo-Proteinsynthese, beispielsweise von unterstützenden Transkriptionsfaktoren, benötigt würde. Für das Id3-Protein ist eine Regulierung auf Transkriptionsebene eher unwahrscheinlich. Die Unterschiede in der Signalübertragung und

eine eventuelle Regulierung der Id-Proteine Id1 und Id2 auch in MCF-7 Zellen auf Transkriptionsebene sollten auf jeden Fall Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse der Western Blots konnten sehr eindrucksvoll zeigen, dass es sich bei der Erhöhung der mRNA von Id1 durch BMP-2 nicht nur um einen Effekt auf Transkriptionsebene handelte, sondern dass dies durchaus zu einer bedeutenden Erhöhung in Bezug auf das Id1-Protein führte. Dabei ließ sich eine leichte Erhöhung auf Proteinebene um etwa das 2fache bereits nach 1h erkennen. In einem vergleichbaren Bereich lag der Anstieg des Id-Proteingehalts nach 2h und 4h. Nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100 ng/ml BMP-2 kam es sogar zu einer Erhöhung um das 6,5fache. Diese deutliche Erhöhung auf Proteinebene zeigte sich für alle drei Id-Proteine und war ebenso reproduzierbar. An anderen Zellsystemen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die BMP-bedingte Induktion der Id-mRNA direkt in einer Erhöhung der Ids auf Proteinebene resultierte (Hollnagel et al., 1999; Korchynskyi und ten Dijke, 2002; López-Rovira et al., 2002).

Der Nachweis einer bestimmten mRNA hat nicht zwangsläufig einen erhöhten Gehalt eines Proteins zur Folge. Deshalb ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit beide Verfahren, das heißt die PCR auf mRNA-Ebene und der Western-Blot auf Protein-Ebene, zum gleichen Ergebnis kamen. Eine Erhöhung des Id1-Proteins bereits nach 1h spricht für eine schnelle Signalübertragung direkt im Anschluss an die BMP-2 Inkubation. Die Möglichkeit einer teilweise direkten Beeinflussung auf Transkriptionsebene mit eventueller Neusynthese sehr kurzlebiger Transkriptionsfaktoren wie von Katagiri und Kollegen an C2C12-Zellen beschrieben scheint auch für unser Modellsystem der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht unwahrscheinlich (Katagiri et al., 1994). Übereinstimmend damit ist auch die Beobachtung, dass der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D die Induktion der Id1-mRNA zumindest teilweise verhindern konnte. Andererseits ist die wirklich signifikante Erhöhung des Id1-Proteins erst nach 24 h zu beobachten. Bedenkt man den rapid-turnover der Id-Proteine mit einer beschriebenen Halbwertszeit von 20-30 min (Bounpheng et al., 1999; Norton, 2000), so sollten für diese späte und sehr starke Erhöhung des Proteingehaltes durch BMP-2 auf jeden Fall mRNA-stabilisierende Prozesse mitverantwortlich sein.

In weiteren Versuchen wurde auch auf Proteinebene der Einfluss der löslichen Form der extrazellulären Domäne des BMP-Typ-I-Rezeptors eBMPR-IA untersucht. Es zeigte sich, dass Zugabe von eBMPR-IA den Id-Proteingehalt der MCF-7 Zellen im Vergleich zur serumfreien Kontrollkultur mit über 70% deutlich reduzierte. Die Unterschiede im Proteingehalt waren hier auf eine bedeutsame Inhibition der endogenen BMP-2 Wirkung zurückzuführen. Das

Ausmaß der Inhibition des Id1-Proteins liegt dabei ebenso wie zuvor auf mRNA-Ebene beschrieben durchaus im Bereich einer durch andere extrazelluläre Inhibitoren erzeugten Hemmung. Piccolo und Kollegen stellten in diesem Zusammenhang in Western Blots heraus, dass Chordin in äquimolarer Dosis die BMP-4-Wirkung inhibieren kann (Piccolo et al., 1996). Ähnliches wurde auch für Chordin und Gremlin beobachtet (Hsu et al., 1998; Ross et al., 2001).

Bei gleichzeitiger Inkubation sowohl mit BMP-2 als auch mit eBMPR-IA kommt es auch auf Proteinebene zu einer weiteren Induktion des Id1-Proteins. Die erhöhten mRNA-Level, die bei einer Inkubation unter serumfreien Bedingungen zu beobachten waren, resultieren demnach ebenfalls in einer erhöhten Id1-Proteinmenge.

Das Verstehen der extra- und intrazellulären Signalübertragung des BMP-2 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in Bezug auf eine Erhöhung der Id-Proteine gewinnt aktuell immer mehr an Bedeutung. In neueren Veröffentlichungen werden BMPs zunehmend mit einer erhöhten Malignität von Tumoren in Zusammenhang gebracht (Ghosh-Choudhury et al., 2000; Pouliot et al., 2003).

Es ist durchaus möglich, dass der durch BMP-2 bedingte veränderte Charakter im Tumorgewebe auch zum Teil auf die in dieser Arbeit und bereits zuvor beschriebene Induktion der Id-Proteine durch BMP-2 zurückzuführen ist (Clement et al., 2000). Die Id-Proteine wurden schon früh als Faktoren beschrieben, die mit dazu beitragen, dass Zellen die Basalmembran durchdringen und so Invasion und Migration begünstigen (Desprez et al., 1995; Desprez et al., 1998). Außerdem nehmen sie bei der Tumor-Angiogenese eine wichtige Schlüsselstellung ein (Lyden et al., 1999). An Id1^{+/-}Id3^{-/-} Mäusen konnte sehr eindrucksvoll gezeigt werden, dass ohne diese beiden Proteine den Knock-out Mäusen ein bedeutender Wachstumsstimulator fehlte und sowohl Tumorgewebe als auch die Metastasen aufgrund einer unzureichenden Vaskularisierung nicht mehr weiter wachsen konnten und sogar nekrotisierten. In einer erst vor kurzem veröffentlichten Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von Id1 mit einem schlechteren klinischen Outcome in Mammakarzinomen korrelierte (Schoppmann et al., 2003). Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Id1-Überexpression und einem erhöhten malignen Potential wurde für Ovar- und Endometriumkarzinome beschrieben (Takai et al., 2001; Schindl et al., 2003). Diese Patientinnen könnten also von einer Hemmung der Id1 Stimulierung als möglichem zukünftigem Therapieansatz profitieren. Vorteilhaft hierbei ist die Tatsache, dass obwohl Id-Proteine während Entwicklung und Tumorigenese weit verbreitet sind, man sie in reifem adultem Gewebe kaum findet (Benezra et al.,

2001, Lasorella et al., 2001). Dieses Ziel wurde auch schon in einem ersten Ansatz von Fong und Kollegen an einem Mausmodell verfolgt. Stabile Infektionen von viraler antisense-Id1 in Mammakarzinomzellen, die dann in Nacktmäuse implantiert wurden, reduzierte deutlich das Auftreten von Lungenmetastasen (Fong et al., 2003). Dabei reichte auch schon eine teilweise Reduzierung des Id1-Protein Niveaus, um deutliche Effekte in Bezug auf das Tumorverhalten zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie die BMP-2 bedingte Induktion der Id-Proteine mit Hilfe eines extrazellulären Inhibitors erfolgreich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene inhibiert wurde. Außerdem tragen die hier gewonnenen Ergebnisse entscheidend zum Verständnis der Signalübertragung des BMP-2 an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bei.

5. Literaturverzeichnis

Albert US KR, Schulze KD. 2002. Prävention und Brustkrebsfrüherkennung. *Onkologie* 8:797-807.

Anglian breast cancer study group. 2000. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 83:1301-1308.

Arnold SF TE, McGrath BE. 1999. Identification of Bone Morphogenetic Proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP-2. *Cytokine* 11:1031-1037.

Bai S, Shi X, Yang X, Cao X. 2000. Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem* 275:8267-8270.

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59.

Benezra R, Rafii S, Lyden D. 2001. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20:8334-8341.

Beral V DR, Peto R, Reeves G. 2001. Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet* 358:1389-1399.

Bounpheng MA DJ, Dodds SG, Christy BA. 1999. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J* 13:2257-2264.

Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. 1996. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382:595-601.

Canalis E, Gabbitas B. 1994. Bone morphogenetic protein 2 increases insulin-like growth factor I and II transcripts and polypeptide levels in bone cell cultures. *J Bone Miner Res* 9:1999-2005.

Chang C, Holtzman DA, Chau S, Chickering T, Woolf EA, Holmgren LM, Bodorova J, Gearing DP, Holmes WE, Brivanlou AH. 2001. Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410:483-487.

Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. 1997. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389:85-89.

Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massague J. 1998. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12:2144-2152.

Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, Monden T, Rotterdam H, Weinstein IB. 1998. Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 58:114-122.

Clement JH, Fettes P, Knochel S, Lef J, Knochel W. 1995. Bone morphogenetic protein 2 in the early development of *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 52:357-370.

- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:271-279.
- Clement JH, Sanger J, Hoffken K. 1999. Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor. *Int J Cancer* 80:250-256.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257:369-373.
- Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, Sympton CJ, Bissell MJ, Campisi J. 1998. A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 18:4577-4588.
- Dickson RB, Lippman ME. 1995. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 16:559-589.
- Feng XH, Derynck R. 1997. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *Embo J* 16:3912-3923.
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:966-978.
- Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe JP, Liu Y, Richards PC, Bennington JL, Lee NM, Debs RJ, Desprez PY. 2003. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13543-13548.
- Germain S, Howell M, Esslemont GM, Hill CS. 2000. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* 14:435-451.
- Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A, Ghosh PM, Moyer M, Abboud SL, Kreisberg J. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1497:186-196.
- Gong J, Ammanamanchi S, Ko TC, Brattain MG. 2003. Transforming growth factor beta 1 increases the stability of p21/WAF1/CIP1 protein and inhibits CDK2 kinase activity in human colon carcinoma FET cells. *Cancer Res* 63:3340-3346.
- Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A. 1994. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* 372:684-686.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:878-883.
- Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y. 1999. Interaction and

- functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem* 274:31577-31582.
- Harbeck N AM, Kuschel B, Kiechle M. 2002. Mammakarzinom- prognostische und praediktive Faktoren. *Onkologe* 8:808-816.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12:186-197.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
- Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-1594.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 274:19838-19845.
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. 1998. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1:673-683.
- Hua X, Miller ZA, Wu G, Shi Y, Lodish HF. 1999. Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13130-13135.
- Ishisaki A, Yamato K, Nakao A, Nonaka K, Ohguchi M, ten Dijke P, Nishihara T. 1998. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 273:24293-24296.
- Iwasaki S, Tsuruoka N, Hattori A, Sato M, Tsujimoto M, Kohno M. 1995. Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 270:5476-5482.
- Jaenicke F PA. 2001. Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst* 93:913-920.
- Jen Y MK, Benezra R. 1996. Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distant from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 207:235-252.
- Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF. 1994. Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors* 11:215-225.
- Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R. 2002. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7:949-960.

- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127:1755-1766.
- Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K. 1998. Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *Embo J* 17:4056-4065.
- Kearns AE, Demay MB. 2000. BMP-2 induces the expression of activin betaA and follistatin in vitro. *J Cell Biochem* 79:80-88.
- Kirsch T, Nickel J, Sebald W. 2000a. Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett* 468:215-219.
- Kirsch T, Nickel J, Sebald W. 2000b. BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *Embo J* 19:3314-3324.
- Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK. 2000c. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7:492-496.
- Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, et al. 1994. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14:5961-5974.
- Korchynskyi O, ten Dijke P. 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277:4883-4891.
- Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR, Rosenbloom J. 2002. Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:183-188.
- Kurisasi K, Kurisasi A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Ten Dijke P, Heldin CH, Ericsson J, Moustakas A. 2003. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* 23:4494-4510.
- Lasorella A UT, Iavarone A. 2001. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* 20:8326-8333.
- Lauritsen KJ, List HJ, Reiter R, Wellstein A, Riegel AT. 2002. A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 21:7147-7155.
- Lecanda F AL, Cheng SL. 1997. Regulation of Bone Matrix Protein Expression and Induction of Differentiation of Human Osteoblasts and Human Bone Marrow Stromal Cells by Bone Morphogenetic Protein-2. *J Cell Biochem* 67:386-398.
- Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Ryoo HM. 2003. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 278:34387-34394.

- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15:3479-3486.
- Lopez-Rovira T, Chalaux E, Massague J, Rosa JL, Ventura F. 2002. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 277:3176-3185.
- Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401:670-677.
- Lyons KM, Jones CM, Hogan BL. 1991. The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet* 7:408-412.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Massague J, Chen YG. 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 14:627-644.
- McDonald NQ, Hendrickson WA. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73:421-424.
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187:265-276.
- Miyazono K, Miyazawa K. 2002. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* 2002:PE40.
- Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75:115-157.
- Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Nakajima T, Oda K, Iwasaka T. 1999. Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ Res* 84:1073-1084.
- Mulder. 2000. Role of Ras and Mapks in TGF β signaling. *Cytokines Growth Factor Rev* 11:23-35.
- Murray-Rust J MN, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA. 1993. Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *structure* 1:153-159.
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J* 16:5353-5362.
- Nayfield SG KJ, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS. 1991. Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 83:1450-1459.
- Nickel J, Dreyer MK, Kirsch T, Sebald W. 2001. The crystal structure of the BMP-2:BMPIA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1:S7-14.

- Norton JD. 2000. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 22):3897-3905.
- Norton JD, Atherton GT. 1998. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol* 18:2371-2381.
- Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. 1998. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8:58-65.
- Ogata T, Wozney JM, Benazra R, Noda M. 1993. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9219-9222.
- Ozaki T SS. 1993. Molecular cloning and characterization of cDNA showing negative regulation in v-src-transformed 3Y1 rat fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2593-2597.
- Pearce JJ, Penny G, Rossant J. 1999. A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev Biol* 209:98-110.
- Phippard DJ W-HS, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake YH, Maxson R, Hill RE, Dale TC. 1996. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. *Development* 122:2729-2737.
- Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM. 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397:707-710.
- Pouliot F, Blais A, Labrie C. 2003. Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* 63:277-281.
- Revillon F BJ, Reyat JP. 2001. Review: ERB2 Oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34:791-808.
- Ross JJ SO, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, Hermanson S, Ekker SC, O'Connor MB, Marsh L. 2001. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410:479-483.
- Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. 1996. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 237:295-302.
- Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, et al. 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267:20352-20362.
- Sano Y HJ, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S. 1999. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor β signaling. *J Biol Chem* 274:8949-8957.
- Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 287:103-115.

- Schindl M, Schoppmann SF, Strobel T, Heinzl H, Leisser C, Horvat R, Birner P. 2003. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 9:779-785.
- Schlessinger J UA. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9:383-391.
- Schoppmann SF, Schindl M, Bayer G, Aumayr K, Dienes J, Horvat R, Rudas M, Gnant M, Jakesz R, Birner P. 2003. Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. *Int J Cancer* 104:677-682.
- Scott IC BI, Pappano WN, Maas SA, Cho KW, Greenspan DS. 2001. Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature* 410:475-478.
- Shi W, Zhao J, Anderson KD, Warburton D. 2001. Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L1030-1039.
- Slamon DJ L-JB, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter P, Pegram M, Baselga J Norton L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J* 344:783-792.
- Smith WC HR. 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* Embryos. *Cell* 70:829-840.
- Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang CC, Hatzistavrou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M, Buckingham M, Hilton D, Nash A, Mohun T, Harvey RP. 1998. DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev* 77:173-184.
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. 2001. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 165:185-193.
- Taylor IC RS, Yaswen P, Stampfer MR, Varmus HE. 1995. Mouse mammary tumors express elevated levels of RNA encoding the murine homology of SKY, a putative receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270:6872-6880.
- ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *curr Opin cell biol* 8:139-145.
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988.
- Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. 1992. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130:1318-1324.
- Tsang M KR, de Caestecker MP, Kudoh T, Roberts AB, Dawid IB. 2000. Zebrafish nma is involved in TGF β signaling. *Genesis* 28:47-57.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899.

- Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. 1989. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8793-8797.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
- Wrana JL AL, Wieser R, Ventura F, Massagué J. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347.
- Yagi K, Tsuji K, Nifuji A, Shinomiya K, Nakashima K, DeCrombrugghe B, Noda M. 2003. Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J Cell Biochem* 88:1077-1083.
- Yeh LC, Mikhailov V, Lee JC. 2001. Regulation of expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat osteoblastic cells by osteogenic protein-1 (BMP-7). *J Cell Biochem Suppl* 36:46-54.
- Zhang Y FX, Derynck R. 1998. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394:909-913.
- Zimmermann LB DJ-EJ, Harland RM. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86:599-606.
- Zou H, Choe KM, Lu Y, Massague J, Niswander L. 1997. BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Hant Biol* 62:269-272.

Anhang

Lebenslauf

Martina Claudia Lichtenberg

Freudenbergstr.121 A Löbderstr. 6
 65201 Wiesbaden 07743 Jena
 Tel. 0611-29878 Tel. 03641-517698
 martinalichtenberg@hotmail.com

Persönliche Daten

Geburtsort: Heidelberg
 Geburtsdatum: 14.06.1978
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Ausbildung

1984 bis 1988	Joseph-v.Eichendorff-Schule in Wiesbaden
1988 bis 1997	Gymnasium am Kurfürstlichen Schloß in Mainz (bilingualer Zug in Englisch)
	Abschluss: Abitur, Note 1,6

Studium

seit 10/ 1997	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
09/ 1999	Physikum, Note 2,6
09/ 2000	1.Staatsexamen, Note: 2,0
02/ 2001- 07/2001	Studium der Humanmedizin an der Universidad de Valladolid, Spanien
09/ 2002	2. Staatsexamen, Note: 1,6
04/ 2003- 04/ 2004	Internistisches Tertial: Universitätsklinikum, Frankfurt/Main
	Chirurgisches Tertial: Hôpital Universitaire de Genève, Genf
	Wahltertial Pädiatrie: Universitätsklinikum, Jena

Weitere Kenntnisse

Sprachen: Englisch (sehr gut in Wort und Schrift)
 Französisch (gut in Wort und Schrift)
 Spanisch (gut in Wort und Schrift)

EDV: guter Umgang mit Microsoft Word, Excel, PowerPoint, EndNote, SPSS

Hobbies: Musik (Klavier, Flöte)
 Sport (Joggen, Aerobic, Schwimmen)

Jena, 26.02.2004

Veröffentlichungen

1. Kongressbeiträge

Wölfl, S., Odyvanova, L., Geyer, A., Frenzel, T., Kühnemund, A., Lichtenberg, M., Hortschansky, P. und Clement, J.H. 2001. Activation of the SMAD-signaling pathway modulates the biological properties of breast cancer cell lines. STS-Jahrestagung, Weimar, 08.-10.11.2001

Lichtenberg, M., Hortschansky, P., Wölfl, S., Höffken, K. und Clement, J.H. 2002. Modulation der BMP2-Wirkung auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. Medizinische Klinik 97: 99 (#074), 108. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 06. – 10.04.02, Wiesbaden

Lichtenberg, M., Hortschansky, P., Clement, J.H., Höffken, K. und Wölfl, S. 2002. Modulation of BMP2 action in the breast cancer cell line MCF-7. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 128 (Suppl. 1): 57-58 (#P295); Deutscher Krebskongress, 10.-14.03.2002, Berlin

Hortschansky, P., Clement, J.H., Lichtenberg, M., Maubach, G. und Wölfl, S. 2001. Extracellular Domain of BMP Receptor IA blocks BMP-2 dependent upregulation of ID proteins in breast cancer cell lines. Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Mannheim, 30.09. - 03.10.2001. Onkologie 24 (Suppl. 6): 123 (#703).

Hortschansky, P., Clement, J.H., Waldau, A., Lichtenberg, M., Maubach, G., Höffken, K. und Wölfl, S. 2002. Extracellular Domain of BMP Receptor IA blocks BMP-2 dependent upregulation of ID proteins in breast cancer cell lines. Second European Conference on Bone Morphogenetic Proteins, 22. - 25.05.2002, Zagreb

2. Vortrag

Lichtenberg, M., Wölfl, S. und Clement, J.H. 2001. Die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA blockiert die BMP-2 abhängige Expression der ID-Proteine in Mammakarzinom-Zelllinien. 6. Jenaer Proteolysetag, 23.11.2001, Eisenberg

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Höffken für die freundliche Überlassung meines Themas und die Möglichkeit, an der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Onkologischen Forschungslabor meine Promotion vorbereiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. J. Clement, der mir überdurchschnittlich gute labortechnische Rahmenbedingungen organisierte und der jederzeit bereit zu wissenschaftlichen Diskussionen war, die mir viele wertvolle Ideen für meine theoretische und praktische Arbeit vermittelten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. Dr. S. Wölf danken, der mit hilfreichen Anregungen und Ratschlägen zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern im Onkologischen Forschungslabor, die mir insbesondere zu Beginn mit viel Geduld und Liebe die wissenschaftlichen Arbeitsweisen gezeigt haben und mir auch im weiteren Verlauf meiner Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt hier Anja Waldau, Dana Hüttig, Conny Jörke, Dr. Manuela Schwalbe und Heike Wahner.

Dr. P. Hortschansky danke ich herzlich für die Bereitstellung der rekombinanten Form von BMP-2 und eBMPR-IA, womit er meine Inkubationsversuche überhaupt erst ermöglicht hat.

Mein Dank gilt auch Dr. H. Hoyer, die mir in Bezug auf die statistische Auswertung meiner Daten beratend zur Seite stand.

Schließlich möchte ich mich auch von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Meiner Mutter, Barbara Lichtenberg, danke ich für ihre wertvolle Unterstützung während meines Studiums, für ihre Schulter zum Anlehnen, ihre Geduld und nicht zuletzt für die Durchsicht der Arbeit. Dank gilt auch meinem Vater, Dr. Wolfgang Lichtenberg, der in mir schon in sehr jungen Jahren das Interesse für die Naturwissenschaft geweckt hat und mich so zu dem werden ließ, was ich heute bin. Und natürlich möchte ich mich auch bei meinen beiden Geschwistern Sören und Christiane bedanken, weil sie immer für mich da sind, und bei meinem Freund, Maximilian Abel, der es immer wieder schafft, mich zum Lachen zu bringen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Joachim Clement, Dr. Heike Hoyer
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 26.02.2004

Martina Lichtenberg, Verfasserin